

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-272988

⑮ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)11月27日

C 12 P 21/00
C 12 N 1/14
15/006712-4B
D-6712-4B
7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全33頁)

⑭ 発明の名称 アスベルギルス オリザにおけるタンパク生成物の製造法

⑰ 特 願 昭62-60276

⑱ 出 願 昭62(1987)3月17日

優先権主張 ⑲ 1986年3月17日 ⑳ デンマーク(DK)㉑ 1226/86

⑳ 発 明 者 エスパー ボエル デンマーク国, 2840 ホルテ, リュングバゲベイ 25
 ㉒ 発 明 者 トベー クリステンセ デンマーク国, 2800 リュンクビュ, 1. テーホー. ボー
 ン レバーデン 10
 ㉓ 発 明 者 ヘレ ファブリシウス デンマーク国, 3540 リュンゲ, ステンデュツセベイ 12
 ウオルデケ
 ㉔ 出 願 人 ノボ インダストリ デンマーク国, 2880 バグスバエルト, ノボ アレ (番地
 アクティーゼルスカブ なし)
 ㉕ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

アスベルギルス オリザにおけるタンパク
生成物の製造法

2. 特許請求の範囲

1. アスベルギルス オリザ (*Aspergillus
oryzae*) におけるタンパク生成物の発現方法であ
って、(a) アスベルギルス オリザ (*Aspergillus
oryzae*) 宿主のゲノム中に1個以上のコピーを組み
込み可能であり且つ遺伝子発現を促進する機能を
暗号化するDNA配列と、形質転換細胞の選択に
好適なマーカーと、所望なタンパク生成物を暗号
化するDNA配列とを有する組換えDNAクロー
ニングベクター系を提供し、(b) 選定された選択マーカー用の顕能遺伝子を
有しないアスベルギルス オリザ (*Aspergillus
oryzae*) を工程(a)からの組換えDNAクロー
ニングベクター系で形質転換し、次いで

(c) 形質転換したアスベルギルス オリザ

(*Aspergillus oryzae*) 宿主を適当な培養基中で培
養する工程から成る方法、2. 遺伝子発現を促進する機能を暗号化する
DNA配列が、プロモーターと、転写開始部位と、
転写ターミネーターおよびポリアダニル化機能を
有する、特許請求の範囲第1項記載の方法、3. プロモーターに対して、上流活性化配列が
先行する、特許請求の範囲第2項記載の方法、4. 選択マーカーが、A. ニドランス *nidulans*
または A. ニガー (*niger*) *argB*、A. ニドランス
(*nidulans*) *trpC*、A. ニドランス (*nidulans*)
amdS、ニューロスボラ クラザーエ (*Neurospora
crassa*) *Pyr4* またはDHFRから誘導される、特
許請求の範囲第1項記載の方法、5. 選択マーカーが A. ニドランス (*nidulans*)
または A. ニガー (*niger*) から誘導される *ArgB* 遺
伝子または A. ニドランス (*nidulans*) から誘導さ
れる *amdS* 遺伝子である、特許請求の範囲第4項記
載の方法、

6. プロモーターおよび上流活性化配列がアミ

BEST AVAILABLE COPY

特開昭62-272988(2)

ラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼまたは解糖酵素のような細胞外あるいは細胞内タンパクを暗号化する遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第3項記載の方法。

7. プロモーターおよび上流活性化配列が、A. オリザ(oryzae) TAKAアミラーゼ、リゾムコールマイヘイ(Rhizomucor miehei) アスバラギン酸プロテナーゼ、A. ニガー(niger) 中性 α -アミラーゼ、A. ニガー(niger) グルコアミラーゼまたはリゾムコールマイヘイ(Rhizomucor miehei) リパーゼについての遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第6項記載の方法。

8. プロモーターがA. oryzae TAKAアミラーゼプロモーターまたはその機能性部分である、特許請求の範囲第7項記載の方法。

9. プロモーターおよび上流活性化配列が以下の配列

GTGGACCG ATTCCGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA
CATACGCCCTC CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT
CAGCGCCTAA AACGCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA

AATCAGAGTC GTCCCCGGTA TTGTCCCTGA GAATGCAATT
TAAACTCTTC TCGGAATCGC TTGGATTCCC CGCCCTAGT
CGTAGAGCTT AAAGTATGTC CCTTGTCCAT GCGATGTATC
ACAACATATA AATACTAGCA AGCGATGCCA TGCTTGGAGC
ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG
AACAAATAAC CCCACAG

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

10. プロモーターおよび上流活性化配列が以下の配列

AGATCTGCCC TTATAAATCT CCTAGTCTGA TCGTCGACGC
ATTCCGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA CATACGCCCTC
CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT CAGCGCCTAA
AACGCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA GTTAGAATCT
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT CGCAGTCCCG
ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC TGATTAAAGG
TGCCGAACCA GCTATAAATG ATATAACAAT ATTAAGCAT
TAATTAGAGC AATATCAGCC CGCGCACCAA AGGCAACTTA
AAAAGCGAAA GCGCTCTACT AAACAGATTA CTTTTGAAAA

GTAGAAATCT ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT
CGCAGTCCCG ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC
TGATTAAAGG TGCCGAACCA GCTATAAATG ATATAACAAT
ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGCC CGCGCACCAA
AGGCAACTTA AAAAGCGAAA GCGCTCTACT AAACAGATTA
CTTTTGA AAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT
TATTAAGCGC CGAAATCAGC CAGATAAAGC CATACAGCCA
GATAGACCTC TACCTATTAA ATCCGCTTCT AGCGCGGCTC
CATCTAAATG TTCTGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT
TACGCACTAC CCGAATCCAT AGAACTACTC ATTTTATAT
AGAAGTCAGA ATTCTACTC TTTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATGCGCG GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC CGCGCCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGC GCTGATATT AGTGAAAAAT
CGTCAAGGGA TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCGGCAAG
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCTTTCAGC GAGAAACCCC
AGCGTCCACA TCACGAGCCA AGGACCACCT CTAGCCATCG
GACCCACCAT CCAATTAGAA GCAGCAAAAG GAAACAGCCC
AAGAAAAAGG TCGGCGCGTC GCGCTTTTCT GCAAGCGTGA
TCACGCGCAG CGATCCAACC AACACCTTCC AGAGTCACTA
CGGCGCGAAA TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCACA

AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCGC
CGAAATCAGC CAGATAAAGC CATACAGCCA GATAGACCTC
TACCTATTAA ATCCGCTTCT AGCGCGGCTC CATCTAAATG
TTCTGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT TACGCACTAC
CCGAATCCAT AGAACTACTC ATTTTATAT AGAAGTCAGA
ATTCTACTC TTTTGATCAT TTTAAATTT TATATGCGCG
GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC CGCGCCAACT CGCTTACCGA
TTACGTTAGC GCTGATATT AGTGAAAAAT CGTCAAGGGA
TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCGGCAAG TCAACAGCAT
CCAAGCCCAA GTCTTTCAGC GAGAAACCCC AGCGTCCACA
TCACGAGCCA AGGACCACCT CTAGCCATCG GACCCACCAT
CCAATTAGAA GCAGCAAAAG GAAACAGCCC AAGAAAAAGG
TCGGCGCGTC GCGCTTTTCT GCAACCTTGA TCACGCGCAG
CGATCCAACC AACACCTTCC AGAGTCACTA CGCGCGGAAA
TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCACA AATCAGAGTC
GTCCCCGGTA TTGTCCCTGA GAATGCAATT TAAACTCTTC
TGCGAATCGC TTGGATTCCC CGCCCTAGT CGTAGAGCTT
AAAGTATGTC CCTTGTCCAT CGGATGTATC ACAACATATA
AATACTAGCA AGCGATGCCA TGCTTGGAGC ATAGCAACCG
ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAC

特開昭62-272988 (3)

CCCACAGAAG GCATTT

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

11. 特許請求の範囲第10項記載の配列に対して、プラスミドpTAKA 17における位置0~1.05の1.05kb無配列上流領域が先行する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

12. ベクター系が更に培養基に発現した生成物の分泌に備えたプロ領域を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

13. プロ領域がアスペルギルス (*Aspergillus*) 種からのグルコアミラーゼあるいはアミラーゼ遺伝子、バシラス (*Bacillus*) 種からのアミラーゼ遺伝子、リゾムコール マイベイ (*Rhizomucor miehei*) からのリパーゼあるいはプロテイナーゼ遺伝子、*S. セレビゼ* (*cerevisiae*) からの α -因子の遺伝子または仔牛のプロキモシン遺伝子から誘導される、特許請求の範囲12項記載の方法。

14. プロ領域が A. オリザ (*oryzae*) TAKAアミ

ラーゼ、A. ニガー (*niger*) 中性 α -アミラーゼ、A. ニガー (*niger*) の酸に安定な α -アミラーゼ、B. リケニフォルミス (*licheniformis*)、 α -アミラーゼ、バシラス (*Bacillus*) NCIB 11837マルトース原性アミラーゼ、B. ステロサーフィラス (*stearothermophilus*) α -アミラーゼまたは B. リケニホルミス ズブチリシン (*licheniformis subtilisin*) の遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第13項記載の方法。

15. プロ領域が以下の配列

ATGATGGTCCGCTGCTGCTCTCTATTTCTCTACGGCCTTCAG
MetMetValAlaIleProTrpSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGln

GTCCGGCGCACCTGCTTTGGCT
ValAlaAlaProAlaLeuAla

を有するTAKA-アミラーゼプロ領域である、特許請求の範囲第14項記載の方法。

18. ベクター系が2個のベクターから成り、一方が選択マーカーを有し、他方は遺伝子発現を促進する機能を略号化するDNA配列と所望なタン

パク生成物を略号化するDNA配列を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

17. アスペルギルス オリザ (*Aspergillus oryzae*) におけるタンパク生成物の産生法であり、特許請求の範囲第1項記載の組換えDNAクローニングベクター系で形質転換されるアスペルギルス オリザ (*Aspergillus oryzae*) 株を適当な培養基で培養して、生成物を培養基から回収する方法。

18. アスペルギルス (*Aspergillus*) におけるタンパク生成物の発現に好適なプロモーターであって、TAKA-アミラーゼプロモーターまたは上流活性化配列が任意に先行する上記プロモーターの機能的部分であることを特徴とするプロモーター。

19. 以下の配列

AGATCTGCCC TTATAAATCT CCTAGTCTCA TCGTCCACGC
ATTCCGAATA CGAGCCCTCA TTAATGATTA CATACCCCTC
CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCACTT CAGCCCTAA
AACGCCCTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA GTTACAATCT
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCCATCT CCGAGTCCCG
ATTCCCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC TGAATTAAGG

TGCCGAACCA GCTATAAATC ATATAACAAT ATTAAGCAT
TAATTAGAGC AATATCAGGC CGCCACCGAA AGGCAACTTA
AAAAGCGAAA CGCCTCTACT AAACAGATTA CTTTTGAAAA
AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCCC
CGAATCAGG CAGATAAAGC CATACAGGCA GATAGACCTC
TACCTATTAA ATCCGCTTCT AGCCGCGCTC CATCTAAATG
TTCTGGCTGT CCGTACAGG CGCATAAAAT TACGCACTAC
CCGAATCCAT AGAAGTACTC ATTTTATAT AGAAGTCAGA
ATTCATAGTG TTTTCATCAT TTTAAATTTT TATATGCGCG
GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC GCGGCGAAGT CCGTTACCGA
TTACGTTAGC CCGTATATT ACGTCAAAAT CCGCAAGGCA
TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAAG TCAACAGCAT
CCAAGCCCAA GTCCITCAGC GAGAAACCCC AGCGTCCACA
TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCC GAGCCACCAT
CCAATTAGAA CGAGCAAAGC GAAACAGCCC AAGAAAAAGC
TCGCGCCGTC GGCCTTTTCT GCAACCGCTCA TCACCGGCA
CGATCCAAAC AACACCCCTCC AGAGTGACTA GGGGCGGAAA
TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCCACA AATCAGAGTC
GTCCCCGGTA TTGTCCTGCA GAATGCAATT TAAACTCTTC
TCCGAATCCG TTGGATTCCC CCGCCCTAGT CCGTAGAGCTT

特開昭62-272988(4)

AAAGTATGTC CCTTCTCGAT GCGATGTATC ACAACATATA
AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGCAGC ATAGCAACCC
ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCTTCTCTG AACAAATAAAC
CCCACAGAAG GCATTT

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する
特許請求の範囲第18項記載のプロモーターおよ
び上流活性化配列。

20. 上流活性化配列に対して、プラスミド
pTAKA 17における位置0~1.05の1.05kb無配列上
流領域が先行する、特許請求の範囲第19項記載
のプロモーターおよび上流活性化配列。

21. 以下の配列

GTCCAGCG ATTCCGAATA CGAGGCGCTCA TTAATGATTA
CATACGCCCTC CCGGTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT
CAGCGCCTAA AACGCCCTTAT ACAATTAAAGC AGTTAAAGAA
GTTAGAATCT ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT
CGCAGTCCCG ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC
TGATTAAGG TCCCGAACCA GCTATAAATC ATATAACAAT
ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC CGCGCAGGAA

ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCTTCTCTG
AACAAATAAAC CCCACAG

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する
特許請求の範囲第19項記載のプロモーターおよ
び上流活性化配列。

3. 発明の詳細な説明

(発明の技術分野)

本発明はアスペルギルス オリザ(*Aspergillus
oryzae*)におけるタンパク生成物の発現法、組換
えDNAベクター、アスペルギルス(*Aspergillus*)
用プロモーターおよび形質転換された菌類に関す
る。

(従来の技術)

今日までに、組換えDNA技術によるポリペプ
チドまたはタンパクを生産するため数多くの方法
が開発されてきた。主な興味は細菌および酵母に
集中されてきたのであり、例えば*E. coli*、
Bacillus subtilis および*Saccharomyces cere-*

AGGCAACTTA AAAAGCGAAA CCGCTCTACT AAACAGATTA
CTTTGAAAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT
TATTAAGCGC CGAAATCAGG CAGATAAAGC CATACAGCCA
GATAGACCTC TACCTATTAA ATCCGCTTCT AGCGCGCCTC
CATCTAAATG TTCTCGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT
TAGGCACTAC CCGAATCGAT AGAACTACTC ATTTTATAT
AGAACTCAGA ATTCATAGTC TTTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATGGCGG GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC CGCGCCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGG CCGTATATTT ACCTGAAAAAT
CGTCAAGGCA TCGAAGACCA AACTAGTAAA ACCCGCGAAG
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCCCTCAGG GAGAAACCCC
AGCGTCCACA TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCACTC
GACCGACCAT CCAATTAGAA GCAGCAAAAGC GAAACAGCCC
AAGAAAAAGC TCGGCGCGTC CGCCTTTTCT GCAACGCTCA
TCACGGGCGC CGATCCAACC AACACCCCTCC AGACTGACTA
GGCGCGGAAA TTTAAAGGCA TTAATTTCCA CTCACCACA
AATCACAGTC GTCCCGGCTA TTGCTCTGCA GAATGCAATT
TAAAGTCTTC TCGGAATCGC TTGCAATCCC CGCCCTACT
CGTAGAGCTT AAAGTATGTC CCTTCTCGAT CGGATGTATC
ACAACATATA AATACTAGCA AGGCATGCCA TGCTTGCAGC

*visiae*は例えば発現および選択系に関して詳細に
特徴化されているものである。

上記の微生物のほかに、*Aspergillus niger* の
ような糸状菌は、詳細に特徴化されている組換え
DNAベクター用の宿主微生物として有望な候補
であり、酵素を商業的に生産するのに広範囲に用
いられている微生物である。形質転換された宿主
微生物から形質転換細胞を選択できる選択マーカ
ーが用いられる形質転換系の開発に、特に努力が
集中されてきた。

過去数年間に*Aspergillus nidulans*の形質転換
のための各種選択マーカースが報告され、菌の細胞
分化を制御する遺伝学的および分子学的方法を研
究する目的で糸状菌*Aspergillus nidulans*の組込
み形質転換の手法が近年になり開発されてきた。

A. nidulans の形質転換は、*Neurospora crassa*
pyr-4 遺伝子 (Ballance, D.J. ら, Biochem.
Biophys. Res. Commun., 第112巻, (1983年),
284~289頁)、*A. nidulans* endS遺伝子 (Tilburn,
J.G. ら, Gene, 第26巻, (1983年), 205~221頁)。

特開昭62-272988(5)

A. nidulans trpC遺伝子(Yellon, M.M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 第81巻、(1984年)、1470~1474頁)およびA. nidulans argB遺伝子(John, M.A.およびPeberdy, J., Microb. Technol., 第6巻、(1984年)388~389頁)を含むプラスミドを用いて説明されてきた。形質転換するDNAは、比較的低い頻度(典型的には1000個未満の形質転換体/1 μ s のDNA)で宿主ゲノムに組込まれることが分かった。

ごく最近に、A. nidulansのamdS遺伝子を用いるAspergillus nigerの形質転換が報告され(Kelly, J.M.とHynes, M.J., EMBO Journal, 第4巻、(1985年)、475~479頁)、amdSは単一の置換源としてのアセタミド上では強力には成長できないAspergillus nigerの形質転換に使用される有力な選択マーカーであることが示された。A. nidulansのargB遺伝子を用いるAspergillus nigerの形質転換も、最近報告された(Buxton, F.P.ら、Gene, 第37巻、(1985年)、207~214頁)。

以下余白

(発明が解決しようとする問題点)

糸状菌Aspergillus oryzaeにおける異種タンパクの発現のための系は、主として、この菌における遺伝子発現の制御法が十分には知られておらず且つクローニングベクター上に好適な選択可能な遺伝子マーカーが欠如していることにより、これまでは開発されなかった。

(問題点を解決するための手段、発明の作用および効果)

本発明によれば、上記の形質転換技法を用いて、異種タンパクを高水準で発現させまたはAspergillus oryzaeにおける同種タンパクの産生を増進させることができる。

本明細書において用いられる「異種タンパク」という表現はA. oryzaeによつては産生されないタンパクを意味し、一方「同種タンパク」という表現はA. oryzae自体によつて産生されるタンパクを意味する。

更に具体的には、A. nigerおよびA. nidulans

の形質転換に用いたマーカー遺伝子を使用することによって、所望なタンパク生成物を暗号化するDNAで形質転換したA. oryzae株の選択が可能である。これら前者の菌類とA. oryzaeとの系統発生的距離(Raper, K.B.およびFennell, D.L., (1985年)The Genus Aspergillus)のために、これはまったく予知されないものであった。

本発明の第一の見地によれば、

(a) アスベルギルス オリザ(Aspergillus oryzae)宿主のゲノム中に1個以上のコピーを組み込み可能であり且つ遺伝子発現を促進する機能を暗号化するDNA配列と、形質転換細胞の選択に好適なマーカーと、所望なタンパク生成物を暗号化するDNA配列とを有する組換えDNAクローニングベクター系を提供し、

(b) 選定された選択マーカー用の機能遺伝子を有しないAspergillus oryzaeを工程(a)からの組換えDNAクローニングベクター系で形質転換し、次いで

(c) 形質転換したAspergillus oryzae宿主を適

当な培養基中で培養する工程から成るAspergillus oryzaeにおいてタンパク生成物の発現法が提供される。

本発明の第二の見地によれば、Aspergillus、具体的にはAspergillus oryzaeおよびAspergillus nigerにおけるタンパク生成物の発現に極めて効果的なプロモーターであつて、TAKA-アミラーゼプロモーターまたは任意に上流活性化配列が先行する上記プロモーターの機能的部分として特徴化されるものが提供される。

本発明の第三の見地によれば、Aspergillus oryzaeにおけるタンパク生成物の産生法であつて、上記のように組換えDNAクローニングベクターを用いて形質転換したAspergillus oryzae株を適当な培養基中で培養し、生成物を培養基から回収する方法が提供される。

使用した形質転換法は、A. nidulansの形質転換法の変法(Ballance, D.J.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 第112巻、(1983年)、284~289頁、Tilburn, J.G.ら、Gene, 第26巻、(1983年))、

特開昭62-272988(6)

205~221頁)、Yelton, M.H.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第81巻、(1984年)、1470~1474頁)および*A. niger*の形質転換についてのBuxtonらの方法、(Gene、第37巻、(1985年)、207~214頁)に類似の方法であった。本発明の方法では、*Aspergillus oryzae*は、宿主株のゲノム中に組込むことができるが、形質転換前は宿主株に有しない選択マーカーを含むベクター系で形質転換される。

好ましい選択マーカーはargB(*A. nidulans*または*A. niger*)、trpC(*A. nidulans*)、amdS(*A. nidulans*)またはpyr4(*Neurospora crassa*)遺伝子、またはDHFR(ジヒドロフォレートレダクターゼまたはその変異株)遺伝子である。更に好ましい選択マーカーはargBまたはaraS遺伝子である。野生型*A. oryzae*株は通常はargB⁺である(すなわち、argB遺伝子が*A. oryzae*において機能的である)。argBを選択マーカーとして選択する場合には、このマーカーに対して遺伝子に欠損を有する*A. oryzae*のargB変異株を宿主株として用いなければ

ならない。*A. oryzae*のargB変異株はF.P. Duxtonらが報告したのと同様にして調製することができる(Gene、第37巻、(1985年)、207~214頁)。argB変異株はオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子に欠損を有する変異株として定義される。他方、amdS遺伝子は、野生型*A. oryzae*株がこの遺伝子を含まないため、この野生株の形質転換の選択マーカーとして用いることができる。

遺伝子配列を促進する機能を暗号化するDNA配列は、典型的にはプロモーター、転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルである。

当業界において周知のように上流活性化配列およびエンハンサー配列が先行することのあるプロモーターは*Aspergillus oryzae*において強力な転写活性を示すことができる如何なるDNA配列であってもよく、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼおよび解糖酵素のような細胞外および細胞内タンパクのいずれをも暗号化する遺伝子から誘導することができる。好適なプロモーターは*A. oryzae* TAKAアミラ

ーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*A. niger* グルコアミラーゼ、*A. niger* 中性α-アミラーゼ、*A. niger* 酸安定α-アミラーゼおよび*Rhizomucor miehei* リパーゼについての遺伝子から誘導することができる。解糖酵素の遺伝子からのプロモーターの例は、TP1、ADHおよびPGKである。

本発明による好ましいプロモーターは、*A. oryzae* TAKA-アミラーゼプロモーターである。TAKAアミラーゼは周知のα-アミラーゼ(Todaら、Proc. Japan Acad.、第58巻、シリーズB(1982年)、208~212頁)である。プロモーター領域を暗号化するDNAは、TAKA-アミラーゼゲノム性クローンから誘導した。プロモーターおよびプロモーターの上流の領域の配列を、フレ領域およびTAKA-アミラーゼについての構造遺伝子の5'末端と共に第1図に示す。

実施例2に更に詳細に説明されるように、フレ領域およびプロモーターおよび上流活性化配列を含むTAKA-アミラーゼを暗号化するDNA配列は、

A. oryzae myceliumから誘導され、BamHIを消化したpBR322に挿入されて、プラスミドpTAKA 17を生成した(第2図を参照されたい)。pTAKA 17 *A. oryzae*から誘導されたDNAは5.5 kb BamHI / *Sau* 3AI-BamHI / *Sau* 3AI フラグメントとして示され、プロモーターおよび上流活性化配列は位置0で開始する2.1 kbフラグメントを表わす。BglII部位までのプロモーターおよび上流活性化配列の確立されたDNA配列を、第1図に示す。プロモーターは、TAKA-アミラーゼアレ配列のMet(1)コドンに先行するヌクレオチド1で終了する。アレ配列を暗号化するヌクレオチド配列は63個のヌクレオチドから構成され、成熟TAKA-アミラーゼはヌクレオチド64に対応する位置から開始する。

pTAKA 17から、プロモーターに対して上流の配列を含む全プロモーター配列またはその機能的部分は、当業者に公知の手段によって誘導することができる。プロモーター配列は、プロモーター配列を、例えば所望なタンパク生成物またはことな

特開昭62-272988(7)

るブレ領域(シグナルヘアチド)を暗号化する遺伝子のような他のDNAとの連結を促進する特異的な制限部位を導入するために、リンカーを備えていてもよい。

本発明による方法では、(Sal I 部位の開始を表わす)ヌクレオチド-1144(第1図を参照されたい)からヌクレオチド-10の配列を、プロモーター領域の十分に機能する部分の一例として使用した。本発明のもう一つの態様では、ヌクレオチド-1178から-1までのヌクレオチド配列は、

pTAKA 17からの未だ配列されていない1.05kbフラグメントが先行した。各種のフラグメントを使用できることは、当業者にとって明らかである。

本発明の一態様によれば、プロモーターおよび上流活性化配列は、第1図におけるヌクレオチド-1144からヌクレオチド-10の配列を表わす下記の配列または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する。

以下余白

```
GTCCAGCG ATTCGGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA
CATACGCCCTC CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT
CAGCCGCTAA AACCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA
GTTACAATCT ACCCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT
CCGAGTCCCC ATTCCGCTAT CAAAACCAGT TTAATCAAC
TGATTAAGG TCCCAACGA GGTATAAATG ATATAACAAT
ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC CCGCCACGAA
AGGCAACTTA AAAAGCGAAA CCGCTCTACT AAACAGATTA
CTTTTGAAAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT
TATTAAGCGC CGAAATCAGC CAGATAAAGC CATACAGCCA
GATAGACCTC TACCTATTA AATCGGCTTCT AGCGCGGCTC
CATCTAAATG TTCTGGCTGT GGTGTACAGC GGCATAAAAT
TACGCACTAC CCCAATCGAT AGAAGTACTC ATTTTATAT
AGAACTCAGA ATTCATAGTG TTTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATCGCGG GTGCTGGCCA ACTCGCTTGC GCGCGCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGC GCTGATATTT ACCTGAAAAT
CGTCAAGCGA TCGAAGACCA AACTAGTAAA ACCCCGGAAG
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCCCTCAGC CAGAAACCCC
AGCGTCCACA TCACGAGCGA AGGACCACTT CTAGGCATCG
GACGCCACCAT CCAATTAGAA GCAGCAAAAGC GAAACAGCCC
```

```
AAGAAAAAGC TCGCCCGCTC CCGCTTTTCT CCAACCGCTGA
TCAGCGCGAG CGATCCAAAC AACACCCCTC ACAGTGAATA
CGCGCGGAAA TTTAAAGCGA TTAATTTCCA CTCACCACA
AATCAGAGTC GTCCCCGGTA TTGTCCTGCA GAATGCAATT
TAAACTCTTC TCGAATCGC TTGCAATCCC CCGCCCTAGT
CCTACAGCTT AAAGTATGTC CCTTGTCCAT CCGATCTATC
ACAACATATA AATACTAGCA AGGGATGCCA TCGTTGGAGC
ATAGCAACCC ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCGTTCTCTC
AACAATAAAG CCCACAG
```

もう一つの態様によれば、プロモーターおよび上流活性化配列は、第1図におけるヌクレオチド-1178から-1までの配列を表わす下記の配列または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する。

```
AGATCTGCC TTATAAATCT CCTAGTCTGA TCGTGCAGCG
ATTCCGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA CATACGECTC
CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT CAGCCGCTAA
AACCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA GTTACAATCT
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT CCGAGTCCCC
```

```
ATTCGCTAT CAAAACCAGT TTAATCAAC TGATTAAGG
TCCCAACGA GGTATAAATG ATATAACAAT ATTAAGCAT
TAATTAGAGC AATATCAGGC CCGCCACGAA AGGCAACTTA
AAAAGCGAAA CCGCTCTACT AAACAGATTA CTTTGA AAA
AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCGC
CGAAATCAGC CAGATAAAGC CATACAGCCA GATAGACCTC
TACCTATTA AATCGGCTTCT AGCGCGGCTC CATCTAAATG
TTCTGGCTGT GGTGTACAGC GGCATAAAAT TACGCACTAC
CCGAATCGAT AGAAGTACTC ATTTTATAT AGAAGTACA
ATTCATAGTG TTTTGATCAT TTTAAATTTT TATATCGCGG
GTGCTGGCCA ACTCGCTTGC GCGCGCAACT CGCTTACCGA
TTACGTTAGC GCTGATATTT ACCTGAAAAT CGTCAAGCGA
TCAAGACCA AACTAGTAAA ACCCCGGAAG TCAACAGCAT
CCAAGCCCAA GTCCCTCAGC CAGAAACCCC AGCGTCCACA
TCACGAGCGA AGGACCACTT CTAGGCATCG GACGCCACAT
CCAATTAGAA GCAGCAAAAGC GAAACAGCCC AAGAAAAAGC
TCGCGCGCTC CCGCTTTTCT CCAACCGCTGA TCAGCGGAGC
CGATCCAAAC AACACCCCTC ACAGTGAATA CCGCGCGGAAA
TTTAAAGCGA TTAATTTCCA CTCACCACA AATCAGAGTC
GTCCCCGGTA TTGTCCTGCA GAATGCAATT TAAACTCTTC
```

特開昭62-272988(8)

TGCGAATCCC TTGGATTCCC CGCCCTACT CGTAGAGCTT
 AAAGTATGTC CTTTGTCCAT GCGATGTATC ACAACATATA
 AATACTAGCA AGGGATCCCA TGCTTGGAGG ATAGCAACCG
 ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAC
 CCCACAGAAG CCATTT

本発明のもう一つの見地によれば、後者の配列では、pTAKA 17からの1.05kb未配列の上流領域(第2図における位置0~1.05)が先行してもよい。

ターミネーターおよびポリアデニル化配列はプロモーターと同じ源から誘導することができる。エンハンサー配列を構造中に挿入してもよい。

発現した生成物は細胞の分裂を要する細胞内に蓄積させて、生成物を単離することができる。この付加的工程を回避し且つ細胞内で発現した生成物の可能な分解量を最少限にするには、生成物を細胞から分泌するのが好ましい。この目的のため、所望な生成物の遺伝子は、発現した生成物を細胞の分泌経路内への効果的に向けるアレ領域を有する。自然に起こるシグナルまたはリーダーペプチ

ドまたはその機能的部分あるいは分泌を行う合成配列であることができる。このアレ領域は、一般的には分泌の際に所望な生成物から開裂して、培養液から単離する準備のできた成熟生成物を残す。

このアレ領域は、如何なる有機物源からのものであっても分泌されるタンパクの遺伝子から誘導することができる。

本発明によれば、アレ領域はAspergillus 種からのグルコアミラーゼまたはアミラーゼ遺伝子、Bacillus 種からのアミラーゼ遺伝子、Rhizomucor nieheiからのリパーゼまたはプロテイナーゼ遺伝子、S. cerevisiae からの α -因子の遺伝子または仔牛プロキモシン遺伝子から誘導することができる。更に好ましくは、アレ領域はA. oryzae TAKAアミラーゼ、A. niger中性 α -アミラーゼ、A. niger酸安定 α -アミラーゼ、B. licheniformis α -アミラーゼ、Bacillus NCIB 11837 からのマルトース原性アミラーゼ、B. stearothermophilus またはB. licheniformis subtilisinから誘導される。有効なシグナル配列は、A. oryzaeTAKA -

アミラーゼシグナル、Rhizomucor niehei アスバラギン酸プロテイナーゼシグナルおよびRhizomucor nieheiリパーゼシグナルである。

TAKA-アミラーゼシグナルは下記の配列を有する。

ATGATGGTCCCGTGGTGGTCTCTATTCTGTACGGCCTTCAG
 MetMetValAlaTrpTrpSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGln

GTCCGGGCACCTGCTTTGGCT
 ValAlaAlaProAlaLeuAla

プロモーターおよびターミネーター配列に機能的に連結した所望な生成物の遺伝子は、選択マーカーを含むベクターに組込むことができ、または宿主株のゲノム中に組込むことができる別個のベクターまたはプラスミド上に置いてよい。本明細書で用いる「ベクター系」という表現は単一ベクターまたはプラスミドまたは宿主ゲノム中に組込まれる全DNA情報を含む2種類以上のベクターまたはプラスミドを包含する。ベクターまたはプラスミドは、線状または閉じた円形分子であってもよい。本発明の好ましい態様によれば、A.

oryzaeは2個のベクターであって、一つは選択マーカーを含み、もう一つは宿主株に導入される残りの異種DNAから成り、プロモーター、所望な生成物および転写ターミネーターの遺伝子およびポリアデニル化配列を含むもので共形質転換される。

通常は、A. oryzae 形質転換体は安定であり、選択マーカーの不在で培養することができる。形質転換体が不安定になる場合には、選択マーカーを用いて培養の際に選択してもよい。形質転換細胞を、次に問題のマーカーに対応する選択圧で培養する。

本発明はA. oryzae において多種多様なポリペプチドまたはタンパク生成物を高収率で製造する方法を提供する。A. oryzae は長年にわたり例えばTAKA-アミラーゼ酵素およびタンパク分解酵素の生産に商業的規模で用いられてきており、従ってこの微生物の醗酵技術は十分に開発されており、この微生物は食品工業において使用されることが証明されている。本発明は、原則として如何なる

特開昭62-272988(9)

ポリペプチドまたはタンパク生成物でも高収量での工業的生産に *A. oryzae* の使用可能性を提供する。かかる生成物の例はキモシンまたはプロキモシンおよび他のレンネット、プロテアーゼ、アミログルコシダーゼ、*Aspergillus* からの酸安定アミラーゼ、菌のリパーゼまたは原生生物のリパーゼおよび熱に安定な細菌または菌のアミラーゼである。

本発明をプロキモシン、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、TAKA-アミラーゼおよび *Rhizomucor miehei* からのリパーゼの生産によって説明する。これらの酵素の遺伝子は、下記に更に詳細に説明するように、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから得た。

(実施例)

以下の実施例において出発物質として使用したプラスミドは次の通りである。

p285 (ATCC No. 20681)

PCAMC91 Doelら、EMBO Journal、第3巻、(1984年)、1581~1585頁。

ATCC 9578、ATCC 14488~11491、
ATCC 11801およびATCC 12892。

E. coli MC1000 (Casabadian, M.J. および Cohen, S.N., J. Mol. Biol., 第138巻、179~207頁)(NCIB 11956)。

Rhizomucor

miehei CBS 370.85

実施例1

プロキモシン遺伝子を含むプラスミド285'proCの調製

ブレアロキモシン遺伝子を仔牛の胃のcDNAライブラリーから単離し、G-CテイリングによってpBR322の *Pst*I 部位に挿入して(Chirgwinら、Biochemistry、第18巻、(1979年)、5294頁およびTruelsensら、Nucleic Acids Res., 第6巻、(1979年)、3061頁)、pR26を得た。pUC9を *Sal*I で切断し、切断をクレノーポリメラーゼで満たし、T4リガーゼで連結した。生成するプラスミドを *Bam*HI-EcoRI で切断して、2.7 kbの大きなフラグメントをプロキモシン遺伝子のN末端を含む

pIC19R Marsh ら、Gene、第32巻、(1984年)、481~485頁。

pSal43 Berse ら、Gene、第25巻、(1983年)、109~117頁、John & Peberdy、Enzyme Microb. Technol.,

p3SR2 J.M. Kelly および M.J. Hynes、EMBO Journal、第4巻(1985年)、475~479頁。

pBR322 Bolivar, F. ら、Gene、第2巻(1977年)、95~113頁。

pBR327 Covarrubias, L. ら、Gene、第13巻、(1981年)、25~35頁。

pUC9、pUC13

およびpUC19 Vieiraら、Gene、第19巻、(1982年)、259~268頁、および Messing, Meth. in Enzymology、第101巻、(1983年)、20~27頁。

使用した菌株は次の通りである。

A. niger ATCC 1015、ATCC 10582

A. oryzae ATCC 20423、IFO 4177、ATCC 1011、

pR26からの0.47kb *Bam*HI-EcoRI フラグメントと連結し、pUC9'を作った。pUC9'は、プロキモシン遺伝子のN末端に *Hind*III 部位を含む。pUC13を *Bam*HI-NarI で切断して、*Nar*I-XbaI と大きなそれぞれの小型フラグメントをプロキモシン遺伝子のC末端を含むpR26の0.84kb *Xba*I-BclI フラグメントと連結して、プラスミドpUC13'を得た。pUC13'は、プロキモシン遺伝子のC末端に *Xba*I 部位を含む。pUC13'の0.65kb *Xba*I-XbaI フラグメントを、pUC9'の0.48kb *Hind*III-XbaI およびp285の1.1kb *Xba*I-HindIII フラグメントと連結して、第3図に示されるようにプロキモシン遺伝子を含むプラスミドp285'proC を生成させた。

実施例2

A. oryzae TAKA-アミラーゼA遺伝子のクローニング

じゃがいも澱粉上で成長させた *A. oryzae* Hu 325から、Kaplanらの方法(Biochem. J., 第183巻、(1979年)、181~184頁)によって、mRNA

特開昭62-272988(10)

を調製した。TAKA-アミラーゼ遺伝子の1050bpを含む部分cDNAクローンを、mRNAをTAKA-アミラーゼにおけるアミノ酸295~299についての暗号化配列に相補的な4-マー・オリゴヌクレオチド混合物

A A A A
5'-GG TT TC TG TT 3' (NOR-168)
G G G G

で特異的に感作することによって得た(Todaら、Proc. Japan Acad.、第58巻、シリーズB、(1982年)、208~212頁)。クローニング法は、Gubler & Hoffmann、Gene、第25巻、(1983年)、263~269頁記載の方法に準じた。cDNAクローンの両端および中央手での配列は、TAKA-アミラーゼのアミノ酸配列に対応する配列が存在することを示した。

ゲノムクローンの単離

A. oryzae IIw 325からの菌糸を収穫して、Boelらの上記文献に記載の*A. niger*について用いた方法に従ってDNAを調製するために加工した。Sau3Aで部分消化することによって生成した3~

10kbの制限フラグメントを、BamHIで消化して、脱リン酸化したpBR322と連結した(New England Biolabs)。50,000個の組換え体をオリゴヌクレオチドプローブNOR-168(上記)でスクリーニングして、7個がTAKA-アミラーゼを暗号化するDNAを含むことを見出した。一つのクローンをmRNA開始2.1kb上流を有するプロモーター領域を更に使用するのに選択した。プラスミドpTAKA 17についての制限マップを第2図に示す。*E. coli*株に移したpTAKA 17を1987年2月23日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen(DSM)、Griesbachstrasse 8, D-3400, Goettingenに寄託され、受託番号DSM 4012を与えられた。DSMは1977年のブダペスト条約で認定された国際寄託当局であり、上記の条約のそれぞれ第9規則および第11規則に従って、公衆による寄託および入手の永続性を付与している。 以下空白

実施例3*Rhizomucor miehei* cDNA ライブラリーの構成

真菌類*Rhizomucor miehei*(この菌種の形態学および系統学的説明については、Shipper, M.A. A., On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*, Studies in mycology, Institute of the Royal Netherlands Academy of Science and Letters, 第17号(1978年)、53~71頁を参照されたい)はチーズ製造におけるミルクの凝固に広く用いられている酸プロテイナーゼ(*Rhizomucor miehei*プロテイナーゼ、以下RMPと省略する)を分泌する。*E. coli*においてこのタンパクのcDNA組換えクローンを得るために、全RNAをBoelら(EMBO J., 第3巻、1097~1102頁、1984年)およびChirgwinら(Biochemistry(Wash.), 第18巻、5294~5299、1979年)の方法によってホモゲナイズした*R. miehei* myceliumから抽出した。ポリ(A)含有RNAを、AvivとLeder(PNAS, USA, 第69巻、1408~1412頁、1972年)によって報告さ

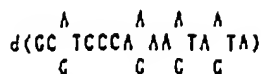
れたオリゴ(dT)-セルロース上で親和クロマトグラフィーを2サイクル行うことによって得た。オリゴ(dT)で感作した相補性DNAを合成して、GublerとHoffman(Gene、第25巻、283~269頁、1983年)が報告した方法に従って二重鎖とした。二重鎖を、Roychoudhuryら(Nucleic Acids Res., 第3巻、101~106頁、1976年)によって報告された方法によって、dCTPおよび末端デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼと連結した。プラスミドpBR327をPstIで線形化して、dGTPと連結した。オリゴ(dC)を連結したdscDNAを、Peacockらが記載した方法(Biochim. Biophys. Acta, 第655巻、243~250頁、1981年)によってこのオリゴ(dG)を連結したベクターにアニーリングして、*E. coli* MC1000のhadR⁻, H⁺誘導体(CasadabanとCohen, J. Mol. Biol., 第138巻、179~207頁、1980年)を形質転換して組換えクローンを生成させるのに用いた。

RMP特異的なcDNA組換え体の同定

16個のヘプタデカマー・オリゴデオキシリボ

特開昭62-272988 (11)

ヌクレオチド



の混合物であって、その一つがTyr-Tyr-Phe-Trp-Asp-Alaを暗号化する領域においてRMP mRNAに相補的であるもの(BeechとFoltmann, Meth Milk Dairy J., 第35巻, 275~280頁, 1981年)をApplied Biosystems, Inc.製DNA合成装置上で合成し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。*Rhizosucor miehei* cDNAライブラリーからの約10,000個の*E. coli* 組換え体をWhatman 540 濾紙に移した。コロニーを、Gergenらが記載した方法によってリーシスして、固定した(Nucleic Acids Res., 第7巻, 2115~2135頁, 1979年)。フィルターを、Boelら(EMBO J., 第3巻, 1097~1102頁, 1984年)によって記載された方法によって³²P-標識したRMP特異的ヘプタデカマー混合物と交雑した。フィルターの交雑と洗浄は40℃で行い、次いでインテンシファイヤー・スクリーンを用いて24時間オートラジオグ

ラフィーを行った。ミニプレプ(Miniprep)プラスミドDNAは、標準的な方法(BirnboimとDoly, Nucleic Acids Res., 第7巻, 1513~1523頁, 1979年)によって交雑するコロニーから単離し、cDNAインサートのDNA配列をMaxamとGilbertの方法(Methods Enzymol., 第65巻, 499~560頁, 1980年)によって確立した。pRNP1016は、mRNAの5'末翻訳末端の部分を含み、次いで69個の酸の長いアレプロ領域と300個のアミノ酸をPMRタンパクの成熟部分に暗号化する領域中に伸びていることを示した。pRNP1016はRMP mRNAの完全な3'末端に対応するインサートを含まなかったため、cDNAライブラリーをクローンpRNP1016からの³²Pニックが翻訳された3'特異的制限フラグメントで再度スクリーニングすることによって、クローンpRNP2931を単離した。このクローンは3'末翻訳領域の部分とRMPタンパクのカルボキシ末端部分を暗号化する270個のトリプレットを有する開放読み込み枠を含む。それ故、pRNP1016および

pRNP2931は著しくオーバーラップしており、2個のクローンの結合した配列は、*R. miehei* アレプロRMP cDNAの配列を与える。1416個のヌクレオチドの総ては、cDNAクローニング法から生成するG:Cテイルの間に配列した。確立したDNA配列を第4aおよびb図に、RMPへの前駆体の推定アミノ酸配列と共に示す。第4aおよびb図では、水平線はcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた合成オリゴ混合物の位置を示している。矢印は、元のRMPの成熟において加工が起こる位置を示している。ヌクレオチドは開始Metコドンにおける第一の塩基から番号を付け、アミノ酸は成熟RMPにおける第一の残基から番号を付けている。このcDNA配列から、RMPは69個のアミノ酸のアレプロで430個のアミノ酸の長い前駆体として合成されると結論することができる。この前駆体における推定上のシグナルペプチダーゼ加工部位(von Heijne, Eur. J. Biochem., 第133巻, 17~21頁, 1983年)は、Ala(-48)およびArg(-47)の間にありと考えら

れ、成熟RMPはGlu-1およびAla(+1)の間での自動タンパク分解性開裂によって生成する。RMPのcDNAで推定したアミノ酸配列は、以前報告された部分的アミノ酸配列(BeechとFoltmann, Meth Milk Dairy J., 第35巻, 275~280頁, 1981年)と良好に一致している。

RMP cDNAを用いて更に構成作業を促進するため、次のようにしてクローンpRNP2931において同定されたTAA停止コドンに対して3'のBanI部位にHindIIIリンカーを挿入した。すなわち、25μg pRNP2931をPstIで消化してRMP cDNAを得た。このインサートを1%アガロースゲル電気泳動法で精製し、ゲルから電気溶出し、フェノールおよびクロロホルム抽出によって精製し、NaClおよびエタノールで沈澱させた。RMPの3'半分を暗号化するこのフラグメントをBanIで消化し、BanI付着制限部位末端を4個のdNTPと*E. coli* DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントとの混合物で満たした。これらの満たした末端にT4-DNAリガーゼ反応において

特開昭62-272988 (12)

HindIII リンカーを加えた。連結反応混合物をフェノールとクロロホルムで抽出して、DNAを4 M酢酸アンモニウム/エタノールで沈澱させた。精製したDNAを過剰量のHindIII 酵素で消化して、380bpフラグメントを6%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。RMP開放読取り枠の3'末端とTAA停止コドンを含むこのフラグメントを、HindIII で消化してアルカリ性ホスファターゼで処理したpIC19Rに連結した。この連結混合物を用いて融合する*E. coli* 細胞を形質転換し、形質転換体をアンピシリン含有斑点プレート上で選択した。プラスミドDNAを形質転換体から精製し、正確な組換体を制限エンドヌクレアーゼ消化とアガロースゲル電気泳動法によって同定した。かかる正確な組換体、pRMP3'から、210bp BglII/HindIII フラグメントを6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって単離した。このフラグメントはアミノ酸 297~299で BglII部位からのRMP cDNAの3'末端を含み、TAA停止コドン中を通して、挿入されたHindIII リンカー

まで伸びている。

RMP cDNAの5'部分は、1%アガロースゲル電気泳動法によって997bp HindIII/BglIIとしてpRMPから単離した。HindIII 部位は、プロセグメントにおいて残基-36、-35に対応する位置においてRMP-DNA中に配置されている。997bp 5'フラグメントをHindIII で消化してホスファターゼ処理したpIC19R中で210bp 3'フラグメントに連結した。この連結混合物を用いて、組換体を*E. coli* から得て、3'部分に結合したRMPの5'部分を有する正確なプラスミドpRMPは制限酵素分析によって同定した。pRMPの構成を第5図に示す。pRMPはRMPアレ領域およびプロセグメントの5'半分を暗号化しない。

実施例4活性RMPを分泌するように設計したAspergillus発現ベクターの構成

この実施例では、プラスミドをグルコアミラーゼプロモーター、シグナルおよびターミネーター

配列の制御下にRMPを発現するように設計して構成した。グルコアミラーゼプロモーターおよびターミネーター配列をベクターpCANG91でクローン化したグルコアミラーゼゲノム遺伝子から誘導した。pCANG91の構成はBoelら(EMBO Journal、第3巻、1984年、1581~1585頁)によって報告されており、プラスミドpCANG91のエンドヌクレアーゼ制限マップは第6図に示す。

pCANG91をSalIおよびPstI制限エンドヌクレアーゼで消化した。上記消化物から、アガロースゲル上で698bpフラグメントを単離した。このSalI-PstIフラグメントはグルコアミラーゼmRNAの140bp 3'未翻訳部分を暗号化する領域を含む。この3'フラグメントはT4-DNAポリメラーゼで処理して、XbaIリンカーの添加およびXbaI制限酵素での消化の前に制限部位を「プラント・エンド」させた。このグルコアミラーゼ遺伝子の3'末端をXbaIで線形化したpUC13に連結してグルコアミラーゼ遺伝子ポリ(A)付加領域を含むプラスミドpANG/Termを生成させた。

pANG/Termの構成は、第7a図に示す。

*A. niger*グルコアミラーゼ遺伝子の3'末端は、pANG/Termからの700bp XbaIフラグメントとして得た。このターミネーターフラグメントを、XbaIで消化してホスファターゼ処理したpIR19Rに連結した。この連結混合物を用いて、*E. coli* から組換体を得られ、正確なプラスミドpICANG/TermであってpIC19Rの多重クローニング部位のHindIII 部位に面するターミネーターフラグメントの5'末端を有するものは制限酵素分析によって同定した。pICANG/Termの構成を、第7a図に示す。pICANG/Termから、グルコアミラーゼターミネーター(AMGターミネーター)領域を1%アガロースゲル電気泳動法によって750bp HindIII/ClaI制限フラグメントとして単離した。

pCANG91から、グルコアミラーゼプロモーター(AMGプロモーター)を、グルコアミラーゼシグナルペプチドを暗号化する領域、ヘキサペプチドプロセグメントおよび3.5 kb ClaI/BssHIIフラグメントとしてのpBR322アンピシリン耐性遺伝

特開昭62-272988 (13)

子(Amp)と共に、1%アガロース電気泳動法によって単離した。合成BamHI/HindIII リンカーは、Applied Biosystems Inc. 製DNA合成装置上で合成した2種類の合成31マー・オリゴヌクレオチドから調製した。合成リンカーは下記の構造を有する。

R V S K Q S E S K D
CGCGTAAGTAAGCAGACGAGCAAGGATA
ATTCATTCGTCGCTCTCGTTCCTATTCGA

このリンカーを、3.5kbグルコアミラーゼプロモーターを含むフラグメントおよび750bpグルコアミラーゼターミネーターを含むフラグメントとの連結反応に用いた。連結混合物を用いて、*E. coli* を形質転換して、正確な組換え体、p673は制限エンドヌクレアーゼ消化によって同定した。単離したp673はHindIII クローニングベクターであり、この中に適当なHindIII cDNAフラグメントをグルコアミラーゼヘキサペプチドプロセグメントおよびグルコアミラーゼ転写ターミネーター領域の間に挿入することができる。挿入したcDNAは

グルコアミラーゼプロモーターによって転写制御され、翻訳された融合生成物の分泌はグルコアミラーゼシグナルペプチドとグルコアミラーゼヘキサペプチドプロセグメントとによって指示される。p673をHindIII で消化して、アルカリ性ホスファターゼで処理して、pRMPの消化物から精製した1.2kbHindIII と連結した。

連結混合物を用いて*E. coli* を形質転換し、RMPを発現させるために正確な位置に挿入されたRMP cDNA を有する組換え体p686は制限エンドヌクレアーゼ消化によって単離されて特徴化された。p686は以下の構造：グルコアミラーゼシグナルペプチド、グルコアミラーゼヘキサペプチド、RMPからのプロペプチドのアミノ酸45から1、成熟RMPの361個のアミノ酸を有するRMP前駆体を暗号化する。p686の構成を、第7b図に示す。

実施例5

本発明の好ましい態様では、アレプロRMPの開放読取り枠を、*A. niger*からのグルコアミラー

ゼ遺伝子または*A. oryzae* からのTAKA-アミラーゼ遺伝子からのプロモーターの制御下において発現プラスミドに挿入すべきである。これを行うために、BamHI制限エンドヌクレアーゼ部位を、次の工程によってアレプロRMPのシグナルペプチドの開始メチオニンコドンの5'に挿入した。pRHP1016を、cDNAにおいてアミノ酸残基Ser(-88)およびGln(-65)に対応する位置で切断するDdeIと、cDNAにおいてアミノ酸残基Lys(-30)およびLeu(-35)に対応する位置で切断するHindIII で消化した。精製する89bp DdeI/HindIII フラグメントを8%ポリアクリルアミドゲル上で精製し、フェノールおよびクロロホルム抽出の後電気溶出し、エタノール沈澱した。以下の配列を有する合成DNAフラグメントは、アプライドバイオシステム社製DNA合成装置上で2個のオリゴヌクレオチドとして合成した。

M L F S
GATCCACCATGCTGTTCTC オリゴ697/698
CTGCTACGACAAGCAAGT

このフラグメントは、開始Met-コドンに対してBamHI付着末端5'および3'末端にDdeI付着末端を有する。これら2個のオリゴヌクレオチドは、ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼでキナーゼ化し、互いにアニーリングして、次いでBamHI/HindIII で消化したpUC13ベクター中でpRHP1016から精製した89bp DdeI/HindIII RMPフラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換え体をミニアレプロ精製プラスミド上で制限酵素消化によって同定した。正確な組換えプラスミドを配列して、使用したオリゴヌクレオチドの配列を証明した。かかる正確なプラスミドpRHP5'をBamHIおよびHindIII で消化して、開始Metコドン、RMPシグナルペプチドおよびRMPプロセグメントの部分を含む110bp BamHI/HindIII フラグメント10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルム抽出し、エタノールで沈澱した。RMP開放読み込み枠の残

特開昭62-272988 (14)

りおよびAMGターミネーター配列をEcoRIで消化し、HindIIIで部分消化した後プラスミドp888から得た。これによって、1.9 kbフラグメントを放出し、このフラグメントをアガロースゲル電気泳動法、電気溶出フェノールおよびクロロホルム抽出の後、エタノールで沈澱させた。この1.9 kbフラグメントを、BamHIおよびEcoRIで消化したpUC13ベクター中でpRH5'からの110bp BamHI/HindIIIに連結した。

この連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換え体をミニプレア精製プラスミド上で制限酵素消化によって同定した。かかる正確な組換え体は、pRHPANGTermであった。

pRHPANGTermの構成を第8図に示す。

実施例6

Aspergillus niger グルコアミラーゼプロモーターによって*A. oryzae* 中で活性RMPを分泌するように設計されたAspergillus 発現ベクターの構成

グルコアミラーゼプロモーターを以下のように

して単離した。25 μ g の pCANG91をEcoRIおよびDsaIII制限エンドヌクレアーゼで消化した。この二重消化の後、270bp DNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって単離することができた。このフラグメントは、プロモーター領域の一部、5' 未翻訳領域およびグルコアミラーゼ遺伝子(AMG遺伝子)のシグナルペプチドをカバーする。アガロースゲルからDNAを電気溶出した後、フラグメントをフェノールおよびクロロホルム抽出し、次いでエタノール沈澱することによって精製した。次いで、270bpの長いフラグメントをSfaNIで消化した。この酵素は、グルコアミラーゼ遺伝子の開始ATGメチオニンコドンに対して5'に開裂部位を有する。完全に消化した後、DNAをDNAポリメラーゼIの大きなフラグメント(Klenow)および4個のdNTP総てで処理して、DNA上にプラントエンドを生成させた。このDNAに、DNAリガーゼを有するBglIIリンカーを加えて、DNAをBglII制限酵素の過剰量で消化した。10%ポリアクリルアミドゲル

上でDNAフラグメントを分離した後、175bp BglIIフラグメントを電気溶出によって単離することができた。このフラグメントは、開始メチオニンコドンに対して5'のSfaNI制限部位に対応する位置に挿入されたBglIIリンカーを有する。このDNA切片をBglIIで消化したアルカリホスファターゼ処理したpIC19Rベクターに連結して、この連結混合物を用いて*E. coli* 細胞を形質転換した。生成する形質転換体の中で、正確なプラスミドをミニプレアプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。かかる正確なプラスミドpB404.1をHsiIおよびBglIIで消化して、グルコアミラーゼ遺伝子の5'未翻訳領域をプロモーター領域の3'部分の約100bpと共に含む0.18bpフラグメントを放出した。このフラグメントを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって精製した。このフラグメントをpCANG91からのグルコアミラーゼプロモーター領域の残りの部分に結合させるため、以下の工程を

行った。25 μ g の pCANG91をDsaIIIで消化した後、更にNdeIで部分的に消化した。フラグメント末端を4個総てのdNTPおよびDNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで満たした後、1.4 kb DNAフラグメントを1%アガロースゲル上で単離した。このフラグメントは、総てのプロモーター領域を5'未翻訳領域およびシグナルペプチド略号化領域と共に含んでいた。このフラグメントを電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって、DNAを濃縮した。NsiIで消化した後、DNAを1%アガロースゲル上で流して、1.2 kb NdeI-NsiIフラグメントを電気溶出によって単離した。このDNAは上記反応でNdeI部位にプラントエンドを生成し、これをHruI-BglIIで消化したpIC19Rベクター中でのpB401.1からの0.16kb NsiI-BglIIフラグメントに連結させた。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する形質転換体の中から、正確な組換え体をミニプレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。上記の正確な組

特開昭62-272988 (15)

換体、p0408.3をHindIII およびBglIIで消化して、グルコアミラーゼ(AMG)プロモーターを1%アガロースゲル上で1.4 kbフラグメントとして単離した。このフラグメントを電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱した。このグルコアミラーゼプロモーターフラグメントを次に、HindIII-EcoRIで消化したpUC19ベクター中のpRMPANKTeraからの2.0 BamHI-EcoRIフラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する形質転換体の中から、正確な組換え体をミニプレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。上記の正確な組換え体の一つp778を大規模に成長させて、組換えプラスミドを単離して、プラスミド調製物をCsCl/臭化エチジウム遠心分離によって精製した。このプラスミドをグルコアミラーゼプロモーターおよびターミネーター配列の制御下においてRMPの合成を指示する。p408.3の構成を第9a図に示し、p778の構成を第9b図に示す。以下余白

実施例7

Aspergillus oryzae TAKA-アミラーゼプロモーターによる活性RMPを分泌させるように設計された*Aspergillus* 発現ベクターの構成

Aspergillus oryzae TAKA-アミラーゼゲノム遺伝子を含むプラスミドpTAKA 17(実施例2を参照されたい)50μgをSalIで消化した。この酵素は、成熟TAKA-アミラーゼのアミノ酸残基26に対応する位置においてゲノムDNAでの制限部位を有する。もう一つのSalI制限部位はこの位置に対して約1300個のヌクレオチドだけ上流の、上流プロモーター領域の5'末端に配設される。SalI消化の後、この1300bpプロモーターを含むフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製し、DNAをフェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって精製した。次いで、DNAをエクソヌクレアーゼIII緩衝液中に溶解して、Henikoff, S. (Gene, 第28巻, 351~359頁, 1984年)の方法に従ってエクソヌクレアーゼIIIで消化した。反応を停止して、それ

ぞれのDNA末端において約130bpの欠失を得た。この方法ではTAKA-アミラーゼ遺伝子の暗号化領域のSalI部位からの約130bpの欠失は、開始メチオニンコドンの上流に多重クローニング部位リンカーを導入する機会を生じる。エクソヌクレアーゼIIIで処理したDNAを、Henikoff, S. (Gene, 第28巻, 351~359頁, 1984年)の方法に従ってS1ヌクレアーゼIIIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出した後エタノールで沈澱した。S1ヌクレアーゼで処理したDNAを補修して連結可能なブラントエンドを得ることは、Henikoff, S. (Gene, 第28巻, 351~359頁, 1984年)の方法に従って、4個のdNTP総てとDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用いて行った。DNAをEcoRIで消化して、1300bp SalIフラグメントで切断して、2群のフラグメントを生成した。一つの群は約380bpの長さであり、蒸留領域を表わしたが、他の群は620bpの長さであり、プロモーター領域を含んでいた。EcoRI消化生成物のこれらの群をアガロースゲル

上で分離して、約620bpの長さのDNAフラグメントを電気溶出して、EcoRI/SmaIで消化したpUC19ベクターに連結した。連結混合物を用いて、融合する*E. coli* 細胞を形質転換し、組換え体から、ミニプレアプラスミドDNAを単離した。これらの欠失変異株を制限酵素消化によって特徴化して、開始メチオニンコドンに対して5'の欠失末端を有するプラスミドを同定した。所望な特徴を有する数個の候補を配列させ、ATG-メチオニンコドンにおけるAに対して9bpを欠失した5'を有する変異株(p9)を選択して、更に構成した。p9をEcoRIおよびHindIIIで消化して、フラグメントを含む845bp TAKA-アミラーゼプロモーターをアガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって単離した。pTAKA 17をSalIおよびEcoRIで消化して、TAKA-アミラーゼプロモーター上流領域を含む510bpフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって単離した。これ

特開昭62-272988 (16)

らの2個のプロモーター領域を互いに連結させ、且つ *Sal*I および *Hind*III で消化した IC19Rベクターに連結させた。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換え体を、ミニプレブとして抽出されたプラスミドを制限酵素で消化することによって同定した。かかる組換え体の一つ p719では、*Aspergillus oryzae* からの TAKA-アミラーゼプロモーターフラグメントは、多数の各種制限酵素消化液によって削除することができる 1.1 kbの移動可能なフラグメントとして見出されている。p719の構成を第10図に示す。

pRMPANGTerm から、プレプロ RMP 開放読取り枠およびグルコアミラーゼターミネーター領域 (ANGTerm) を、*Bam*HI および *Eco*R I で消化した後 2 kb フラグメントとして単離した。このフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、次いでフェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって精製した。*A. oryzae* からの TAKA-アミラーゼからのプロモーターを、p719を *Sal*I および *Bam*HI で消化した後得られる 1.1

kb フラグメントとして単離した。このフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出、次いでエタノールでの沈澱によって精製した。1.1 kb プロモーターフラグメントを *Sal*I および *Eco*R I で消化した pUC19ベクターにおいて pRMPANGTerm から 2 kb *Bam*HI / *Eco*R I フラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する組換え体から、正確な組換え体を、ミニプレブプラスミドを制限酵素で消化することによって同定した。かかる正確な組換え体の一つ p777 を大規模に成長させて、組換えプラスミドを単離し、プラスミド調製物を *Cs*Cl / 臭化エチジウム過心分離によって精製した。p777 の構成を第11図に示す。

実施例 8

Aspergillus oryzae TAKA-アミラーゼプロモーターの制御下による *Rhizogucor miehei* リパーゼを分泌させるように設計された *Aspergillus* 発現ベクターの構成

以下空白

E. coli におけるリパーゼ cDNA クローンの構成および同定

特異的オリゴヌクレオチドプローブを構成させることができる情報を得るため、精製した *Rhizogucor miehei* リパーゼ (Moskowitz, G.J. ら, *J. Agric. Food Chem.*, 第25巻, 1977年, 1146~1150頁) について部分配列を決定した。以下の説明では、RML という略号を *Rhizogucor miehei* リパーゼについて用いた。菌糸体および低分子量物質を除去した *Rhizogucor miehei* の培養液からの上澄液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。カラムからの主要な脂肪分解性分画を、凍結乾燥する前に脱塩および限外ろ過した。次いで、凍結乾燥した粉末を、親和性クロマトグラフィーに付した。カラムからの貯蔵したリパーゼ分画を脱塩して、限外ろ過によって濃縮した。次いで、この濃縮液を疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) に付して、HIC-精製からのリパーゼを用いてアミノ酸配列を決定した。配列の決定は、元の酵素 (N-末端配列) およびリパーゼを

Armillaria mellea プロテアーゼを用いてタンパク分解性消化を行った後に得られる選択されたフラグメントの両方について行った。配列の決定は、This, L. ら, (*FEBS Lett.* 1987年、印刷中) によって報告されたのと同じ方法で Gas Phase Sequencer (Applied Biosystems Model 470A) で行った。

RML を、酵素の基質に対する比率を 1 : 40 (モル : モル) としたことを除いて Moody ら (*FEBS Lett.*, 第172巻, 1984年, 142~148頁) によって報告されたのと同じ *Armillaria mellea* プロテアーゼを用いて消化した。得られたフラグメントを HPLC によって分離して、UV 吸収を 280nm および 214nm で観察した。オリゴヌクレオチドプローブの構成のための好適なフラグメントを同定するには、これらのフラグメントは Try および / または Tyr を含むので、280nm および 214nm の間で高い比率を示したペプチドのみを配列した。

以下の N-末端配列が、元の RML を使用することによって見出された。

- 701 -

特開昭62-272988 (18)

ている。矢印は、元のRMLの成熟において加工が起こる位置を示す。ヌクレオチドは、開始Metコドンでの最初の塩基から番号を付け、アミノ酸は成熟した元のRMLにおける最初の残基から番号を付ける。RMLを開始Metコドンから伸びている開放読み込み枠によって暗号化し、次いで停止コドンに達する前に363コドンを通る。この前駆体では、最初のアミノ酸残基は、典型的な疎水性シグナルペプチドから成る。von Heijne (Eur. J. Biochem., 第113巻、17~21頁、1983年)の生産則によれば、シグナルペプチドは、それぞれ、位置-71および-70でのAla-およびVal残基の間のシグナルペプチダーゼ開裂によって以下のプロペプチドから開裂する。

*Rhizococcus siehei*からの培養液の上澄みから得られる精製RMLのN末端アミノ酸配列分析は活性RML酵素のN末端としてSer-Ile-Asp-Gly-Gly-Ile-Argを同定したので、RML前駆体のプロペプチドは前駆体における次の70個のアミノ酸残基から成っていた。このN末端Ser残基から

始めて、成熟RMLは停止コドンに達するまでに269個の残基を通過して伸びる。この成熟29500ダルトン酵素では、リパーゼ結合部位は、多数のリパーゼに保存されている残基Ser(144)の付近に配置される。RML mRNAの3'末端では、104個のヌクレオチドがTAA停止コドンとポリ(A)テイルとの間の未翻訳領域として配置された。このポリ(A)テイルに対して23ヌクレオチド5'では、7AT塩基対から成る反復構造が見出されたが、典型的な真核生物のポリアデニル化シグナルは同定されなかった。

本発明の好ましい具体例では、RML cDNAについて多くの変更を行った。これらの変更は、開放読み込み枠に対して制限エンドヌクレアーゼ部位5'および3'をクローニングおよび付加の際に、cDNAに加えたG:Cテイルの除去を含む。多くの好都合な制限部位も、cDNAのシグナルペプチドおよびプロペプチド領域に導入された。

p353.18をFnuDIIで消化して、アガロースゲル

電気泳動によって880bp DNAフラグメント(RML cDNAの3'末端)を単離した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱した。

RML cDNAの3'末端を次いでSmaIで消化し且つアルカリ性ホスファターゼで処理したpUC19ベクターに連結した。連結反応を用いて、競合する*E. coli*細胞を形質転換し、精製した形質転換体から正確な組換え体をミニプレプラスミドの制限酵素消化によって同定した。一つのかかる好適な組換え体p435.2をBamIおよびHindIIIで消化し、0.69kbフラグメントをアガロースゲル電気泳動法で単離した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱した。RML cDNAのフラグメントは、3'未翻訳領域に結合したpUC19多重クローニング部位の主要部分を有していた。

RML cDNAの5'末端を、合成オリゴヌクレオチドを用いて再設計して、好都合な制限部位を導入した。合成フラグメント(RML 5')の

DNA配列を第14図に示す。導入した制限部位の位置および個々に合成したオリゴヌクレオチドの結合部位を水平線乃至垂直/水平線によって示す。精製するフラグメント(RML 5')を2%アガロースゲル上で150bpフラグメントとして精製し、電気溶出し、フェノールおよびCHCl₃で抽出し、更に連結反応を行う前にエタノールで沈澱した。

p353.7をBamIおよびBamIIで消化して、387bp RMLフラグメントを10%ポリアミリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出した後、エタノール沈澱をして、次いで合成RML 5'フラグメントおよびBamI/HindIIIで消化したpUC13ベクターにおいてp435.2からの0.69kb BamI/HindIIIフラグメントに連結した。連結反応を用いて、競合する*E. coli*を形質転換して、精製する形質転換体から正確な組換え体をミニプレプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。一つのかかる正確な組

特開昭62-272988 (19)

換体p8544'では、合成部分を配列して予想した構造を確認した。p8544の構成を第13a図に示す。p8544からブレアプロRML cDNAをアガロースゲル電気泳動法によって、1.2 kb BamHI フラグメントとして単離した。*Aspergillus oryzae* TAKA-アミラーゼ遺伝子からのプロモーターおよび*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ遺伝子からのターミネーターに基づく発現ベクターを、以下のようにして調製した。p719(実施例7参照)をSalIおよびBamHIで消化した。生成する1.1 kb TAKA-アミラーゼプロモーターフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製した。pICMG/Tera(実施例4参照)は、BamHIおよびEcoRIで消化した。生成する0.75 kb TAKA-アミラーゼターミネーターフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製した。フェノールおよびクロロホルム抽出の後、これらの2種類のフラグメントをエタノールで沈澱し、SalI/EcoRIで消化したpUC19ベクターに連結した。連結反応を用いて、*E. coli*を形質転換して、精製

する形質転換体から正確な組換体をミニプレブプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。一つのかかる正確な組換体p775をBamHIで消化して、アルカリ性ホスファターゼで処理した。p8544からの1.2 kb BamHI RMLブレアプロcDNAフラグメントをこのp775ベクターに連結して、*E. coli*中に形質転換した。プロモーターとターミネーターとの間で正確な位置に挿入されたRMLブレアプロcDNAを有する組換えp787を、*E. coli*形質転換体から抽出したミニプレブプラスミド上で制限酵素による消化によって同定した。p787プラスミドDNAを大規模に成長させて、プラスミド調製物をCaCl₂/臭化エチジウム塩心分離によって精製した。p787の構成を第13b図に示す。

実施例9

*Aspergillus oryzae*の形質転換(一般的処理法)
100mlのYPD (Shermanら、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981年)に*A. oryzae*, IFO 4177またはそのargB変

異株の胞子を接種して、振盪しながら37℃で約2日間培養した。ミラクロスを通して濾過することによって菌糸を回収して、0.6 MのNa₂SO₄ 200 mlで洗浄した。菌糸を15 mlの1.2 MのNa₂SO₄、10 mMのNaH₂PO₄、pH=5.8に懸濁させた。懸濁液を氷で冷却し、Novozym[®] 234、パッチ1887を120ml含む緩衝液1 mlを加えた。5分後、1 mlの12 mg/ml BSA (Sigma, H 25型)を加えて、緩やかに攪拌しながら1.5~2.5時間37℃でインキュベーションし、顕微鏡下で検討した試料中において多数の原形質体が観察されるようになるまで継続した。

懸濁液をミラクロスを通して濾過し、濾液を無菌チューブに移して、5 mlの0.6 Mソルビトール、100 mM トリス-HCl、pH=7.0を積層した。

1000gで15分間遠心分離を行い、原形質体をNa₂SO₄クッションの上部から収集した。2容量のSTC (1.2 Mのソルビトール、10 mMのトリス-HCl、pH=7.5、10 mMのCaCl₂)を原形質体懸濁液に加えて、混合物を1000gで5分間遠心

分離した。原形質体ペレットを3 mlのSTCに再懸濁して、再度成型した。これを繰り返した。最後に、原形質体を0.2~1 mlのSTCに再懸濁した。

100 μlの原形質体分散液を5~25 μgの適当なDNAを10 μlのSTCに懸濁したものと混合した。argB株からの原形質体をpSal43 DNA (*A. nidulans* argB遺伝子を担持するプラスミド)およびargB⁺株からの原形質体をp3SR2 (*A. nidulans* argB遺伝子を担持するプラスミド)と混合した。混合物を室温で25分間放置した。0.2 mlの60%PEG4000 (BDH29576)、10 mMのCaCl₂および10 mMのトリス-HCl、pH=7.5を加えて、注意深く混合し(2回)、最後に0.85 mlの上記溶液を加えて、注意深く混合した。混合物を室温で25分間放置し、2500gで15分間遠心分離し、ペレットを再度2 mlの1.2 Mソルビトールに懸濁した。もう一回沈澱させてから、原形質体を適当なプレートに塗布した。pSal43で形質転換したargB株からの原形質体を炭素および窒素源

特開昭62-272988(20)

として、それぞれグルコースおよび尿素を有し且つ浸透圧安定のために1.2 Mソルビトールを含む最少限のアプレート(Cove, Biochem. Biophys. Acta, 第113巻, 1966年, 51~58頁)に拡げた。p3SR2で形質転換したargD⁺株からの原形質体を、1.0 Mスクロース、pH=7.0、窒素源として1.0 mMのアセタミド、およびバックグラウンド成長を抑制する2.0 mMのCsClを含む最少限のアプレート(Cove, Biochem. Biophys. Acta, 第113巻, 1966年, 51~58頁)に塗布した。37℃で4~7日間インキュベーションした後、胞子を回収して、滅菌水に懸濁し、塗布して単一コロニーとした。この処理法を繰り返して、2回の再分離の後、単一コロニーの胞子を定殖した形質転換体として保存した。

実施例10

野生型 *A. oryzae*におけるTAKA-アミラーゼの発現

pTAKA 17を、実施例9に記載したように*A. nidulans* からのamdS遺伝子を含むp3SR2で共形質

転換することによって、*A. oryzae* IF0 4177中に形質転換した。上記のように調製した原形質体を等量のpTAKA 17およびp3SR2 であってそれぞれ約5 μgを用いた混合物とインキュベーションした。単一窒素源としてアセタミドを用いることができる9個の形質転換体を、2回再度単離した。YPD (Shermanら, 1981年)上で3日間成長させた後、培養液上澄みをSDS-PAGEによって分析した。ゲルを、コマージー・ブリリアント・ブルーRで染色した。最良の形質転換体は、形質転換していないIF0 4177の10~20倍のアミラーゼを生成した。一つの形質転換体を更に研究するために選択して、2リットルKjeller醗酵装置中で4%大豆ミール上で成長させ、成長中にグルコースを供給した。醗酵中に、培養液を激しく攪拌した。これらの条件下では、IF0 4177は約1 g/lを生じ、形質転換体は酵素活性として測定したところ約12 g/lのアミラーゼであった。酵素活性を澱粉を分解する能力として測定した(Cereal Chemistry, 第16巻, 1939年, 712~723頁)。使用した澱粉

はHerck Asylum solubilex B.6であり、分析はpH4.7および37℃で行った。外部からβ-アミラーゼを加えなかった。

実施例11

*A. oryzae*におけるRMPの発現

実施例7からのp777または実施例6からのp778を、実施例9に記載の処理法によってp3SR2と共に共形質転換することによってIF0-4177中へ形質転換した。形質転換体を選択して、実施例9に記載のように再度単離した。

形質転換体をYPD中で3日間成長させ、上澄みをSDS-PAGEの後にWestern blottingおよびELISAを行って分析した。p777およびp778からの形質転換体の上澄液は、RMP抗体と反応するタンパク50~150 μg/lを含んでいた。プロテイナーゼは、*R. miehei*で生成したプロテイナーゼと比較して過剰にグリコシル化した。2つの形状のうち、一方はプロ型であり、他方は加工された成熟プロテイナーゼであると思われた。p778の2種類の形質転換体およびp777の3種類の

形質転換体を、上記TAKA-アミラーゼ形質転換体と同様に醗酵装置中で成長させた。p778の2種類の形質転換体は、Kunitz法(Kunitz, M., Jour. Gen. Physiol., 第18巻, 1935年, 459~466頁)によるミルク凝固活性として測定したところ、約0.2 g/lおよび0.4 g/lのRMPを生じ、p777の3種類の形質転換体は約0.5 g/l, 2.4 g/lおよび3.3 g/lのRMPを生じ、粗換えRMPの特異的活性は*Rhizomucor miehei*の活性と同じであると考えられた(これについては、後で確認した)。SDS-PAGEおよびSDA-PAGEの後にWestern-blottingおよびELISAを行ったところ、大規模で培養する場合には、1つの形状のRMPのみが存在することが判った。RMPはこれらの成長条件下でも、過剰にグリコシル化した。ゲル上にみられるタンパクの量は、酵素活性から予測された量とよく相関を有した。

RMPを親和性クロマトグラフィーおよび寸法排除クロマトグラフィーによって培養液の上澄みから精製した。

特開昭62-272988 (21)

精製した組換えRMPのN-末端配列を、Thim
ら(TEBS Lett、1987年、印刷中)によって報告さ
れたのと同様に気相配列装置を用いて、測定した。

組換えRMPの2つの形状はN-末端における
加工が不均一であることを示した。一つの形状は
Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Thr-Pro-Gly-Tyr-のN
-末端配列を有し、もう一方はGly-Ser-Val-Asp-
Thr-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp-のN-末端配列を有し
た。N-末端でのかかる不均一加工も、Mucor
mieheから元のRMPについて記載されている
(Paquet, D.ら、Neth. Milk Dairy J., 第35巻、
1981年、358~380頁)。組換えRMPの不均一加
工は元のRMPの不均一加工と良好な相関を有し、
A. oryzae は本発明によれば正確な領域で組換え
RMPを加工することができることが判った。

実施例12A. oryzae におけるプロキモシンの産生に就い
ての発現単位の構成

この構成は、A. oryzae アミラーゼプロモー
ターの制御下でA. oryzae TAKA-アミラーゼ遺伝子

からのシグナルペプチド配列がすぐ先行するプロ
キモシン遺伝子を含む。この構成は更に、A.
nigerグルコアミラーゼ遺伝子とE. coli複製体か
らのからのターミネーターを含む。

p285' proC(実施例1参照)からの約430 bp
DnaH I / Xma I フラグメントおよび以下の配列
AATTCACGCTGCCGCGGCCGACATCACCAG
GGTCGACGCGCGCGCTCTAGTCTCTAG

を有する合成オリゴマーをEcoR I - Xma I 切断
pUC19プラスミド中に挿入して、プラスミド
pToC50aを生成した。

pToC50aをEcoR I - Sac II で切断し、pUC19を含
む大きなフラグメントとプロキモシン遺伝子(「
プロキモシン」)の5'部分を単離した。このフ
ラグメントを pTAKA17からの0.6 kb EcoR I -
Bam I フラグメントおよび以下の合成オリゴマー
と連結した。

GCACCTGCTTTGGC
CACCAGAAC (KFN 280/281)

形質転換の後、A. oryzae TAKA-アミラーゼ遺

伝子(ブレTAKA)からのシグナル配列に融合し且つ
約500bp 上流のTAKA-アミラーゼ配列が先行する
プロキモシン遺伝子(「プロキモシン」)の5'部分
を含むプラスミドpToC51を単離した。pToC51の構
成を第15a図に示す。

pR26をHinf I で切断して、DNAポリメラーゼ
Iおよび4個のdNTPの大きなフラグメント
(Klenow)で処理し、Xma I で切断した。プロキモ
シン遺伝子の3'末端を含む750bpフラグメント
を単離した。このフラグメントの3'末端での
Hind IIIを挿入するために、pUC9をXma I / Hind III
で切断して、大きなフラグメントをプロキモシン
遺伝子の3'末端を含む750bpフラグメントに連
結した。

pTAKA 17からの5.6 kb EcoR I - Cla I フラグ
メントを単離して、同じプラスミド貨せの2.6 kb
Cla I - Hind IIIフラグメントおよびA. nigerグル
コアミラーゼ遺伝子ターミネーターおよびポリA
部位を含むpICANC/Term(実施例4参照)からの
0.7 kb EcoR I - Hind IIIと連結した。生成するプ

ラスミド輪pToC52として第15b図に示す。

pToC52をHind III で切断し、EcoR I で部分的に
切断し、6.4 kbフラグメントを単離した。これを
pToC51からの0.9 kb EcoR I - Xma I フラグメント
およびプロキモシン遺伝子(「プロキモシン」)の3'
部分を含むpUC9'PCからの0.7 kb Xma I - Hind III
フラグメントと連結した。生成するプラスミドは
pToC56と呼ばれ、第15b図に示す。

実施例13A. oryzae におけるプロキモシンの発現

p3SR2(aadS遺伝子)またはpSal43(argB遺伝子)
と共形質転換することによって、pToC56をA.
oryzae IF0 4177 またはargB変異株に形質転換し
た。選択的培地で成長する形質転換体を、実施例
9と同様に2回再度単離した。

形質転換体をYPD中で3日間成長させ、上澄液
のプロキモシン含量をSDS-PAGE後Western
ブロット上でELISAによって分析した。形質
転換体は、上澄液中に1~10ng/lのプロキモ
シンの寸法免疫反応性タンパクを産生した。他の

特開昭62-272988 (22)

免疫反応性タンパクは上澄液中に検出されなかった。

実施例 14

A. *oryzae* における RML の発現

実施例 8 からの p787 を、実施例 9 に記載の方法によって p3SR2 で共形質転換することによって IF0-4177 中に形質転換した。形質転換体を実施例 9 と同様に選択して、再度単離した。

3 日間成長させた形質転換体の YPD 培養液からの上澄液を、SDS-PAGE の後に Western ブロットおよび ELISA を行って分析した。最良の形質転換体は、タンパク 1 リットル当り 2 mg の成熟 RML の産生を産生した。上澄液におけるリパーゼ活性を、トリブチリンを開裂する能力として計測した (NOVO 法 AF 95.1/3-CB)。

この測定によって上澄液に 2 mg/l の活性リパーゼが存在することが判った。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、TAKA-アミラーゼプロモーターおよび上流プロモーター領域の DNA-配列を示し、

第 2 図は、プラスミド pTAKA 17 のエンドヌクレアーゼ制限マップを示し、

第 3 図は、プラスミド p285 proC の構成を示し、

第 4 a および b 図は、3 文字省略によって与えられる推定アミノ酸配列を有するブレアロ *Rhizomucor miehei* アスバラギン酸プロテイナーゼの DNA 配列を示し、

第 5 図は、プラスミド pRMP の構成を示す。

第 6 図は、プラスミド pCAHC91 のエンドヌクレアーゼ制限マップを示し、

第 7 a 図はプラスミド p1CAHC/Term の構成を示し、

第 7 b 図は、プラスミド p888 の構成を示し、

第 8 図は、プラスミド pRNPANGTerm の構成を示し、

第 9 a 図は、プラスミド p8408.3 の構成を示し、

第 9 b 図は、プラスミド p8778 の構成を示し、

第 10 図は、プラスミド p8719 の構成を示し、

第 11 図は、プラスミド p777 の構成を示し、

第 12 図は、3 文字省略によって与えられる推

定アミノ酸配列を有するブレアロ *Rhizomucor miehei* リパーゼ cDNA の配列を示し、

第 13 a 図は、プラスミド pB544 の構成を示し、

第 13 b 図は、プラスミド p787 の構成を示し、

第 14 図は、合成フラグメント RML5' の DNA 配列を示し、

第 15 a 図は、プラスミド pToC51 の構成を示し、

第 15 b 図は、プラスミド pToC56 の構成を示す。

特許出願人

ノボ インダストリ

アクティーゼルスカブ

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗

弁理士 西 館 和 之

弁理士 石 田 敬

弁理士 山 口 昭 之

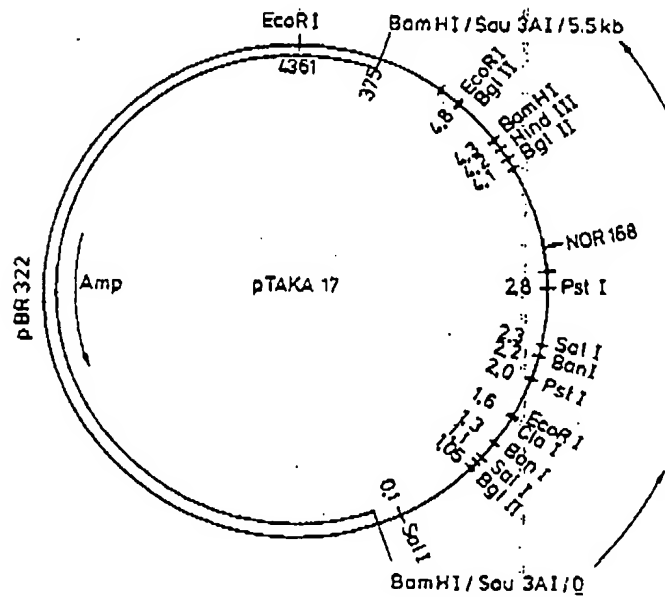
弁理士 西 山 豊 也

FIG. 1

-1176	AGATCTGCC	TTATTAATCT	CCTAGTCTGA	TGCTCGACGC	ATTCGGAATA	-1127
-1167	CGAGGCGCTGA	TTAATGNTTA	CATACGCCCTC	CGGGTAGTAG	ACCGAGCAGC	-1137
-1076	CGAGCCAGT	CAGCGCCTAA	ARCGCTTAT	ACAAATPAAGC	AGTAAAGAA	-1147
-1026	GTTAGAATCT	ACGCTTAAA	AGCTACTTAA	AAATCGATCT	CGCAGTCCG	Sal I
-976	ATTCGCCCTAT	CMAAACCAT	TTAATCAAC	TGATTAAGG	TCCCGAAGCA	
-926	GCTATAAATG	ATATACAAT	ATTAAAGCAT	TAATPAGAC	AAATCATAGGC	
-876	CGCGCACGAA	AGGCAACTTA	AAAGCGAAA	CGGCTCTACT	AAACAGATTA	
-826	CTTTTGRAAA	AGGCACTCA	GTATTTAAG	CCCGAATCTT	TATTAAGCGC	
-776	CGAAATCAGG	CAGATAAGC	CATACAGCA	GATAGACCTC	TACCTATTAA	
-726	ATCGGCTTCT	AGCGCGCTC	CATCTAATG	TTCTGGCTGT	GGGTACAGG	
-676	GGCATAAANT	TACGCCTAC	CCGAATCGAT	AGAACTACTC	ATTTTATAT	
-626	AGAAGTCAGA	ATTCATAGTG	TTTGATCAT	TTTAAATTTT	TATATGGCGG	
	ActRI					
-576	GTGGTGGGCA	ACTGCTTGC	CGGGGCAACT	CGCTTACCGA	TACGTTAGG	
-526	GCTGATATTT	ACGTGAANT	CCTCAAGGA	TGCAAGACCA	AGTAGTAAA	
-476	ACCCCGAAG	TCACACAGAT	CGAAGGCCAA	GTCTTCACG	GAGAAACCC	
-426	ACGGTCCACA	TCACGAGGA	AGGACACCT	CTAGSGCATCG	GACGCACCAT	
-376	CCAAATTGAA	GCAGCAAGC	GAACAGCCC	AAGAAAAGG	TGCGCCGTC	
-326	GGCCTTTTCT	GCACGCTGA	TCACGGGCAG	CGATCCAAAC	AACACCTCC	
-276	AGAGTGACTA	GGGCGGAAA	TTTAAAGGA	TTAATTTCCA	CTCAACCA	
-226	AATCACAGTC	GTCCCCGGTA	TGTCCTGCA	GAATGCAAT	TAACTCTTC	
-176	TCCGAATCCG	TTGATTTCCC	CGCCCTACT	CGTAGAGCTT	AAAGPATGTC	
-126	CTTTGTGGAT	CGGATGTATC	ACACATATA	AACTATAGCA	AGGATGCCA	
-76	TGCTTGGAGG	ATAGCAACCG	ACAACATCAC	ATCAAGCTCT	CCCTTCTCTG	
-26	AACAATPAAC	CCACAGAAG	GCATTT			-1

4 14 24 34 44 54
ATCATGGTCGGCTGGTCTCTATTCTGTACGGCCCTCAGTTCGGCGCACCTGCTTTG
MetMetValAlaIleTTPSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGlnValAlaAlaProAlaLeu
64 74 84 94 104 114
GCTGCAACGCTCGCGGACTGGCGATCGCAATCCATTATTCTCTTCACGGATCGATT
AlaAlaThrPheAlaAspTTPArgSerGlnSerIleTyrPheLeuLeuThrAspArgPhe
124 134
GCAAGGACCGGATGGGTCGAC
AlaArgThrAspGlySer

FIG. 2



特開昭62-272988 (24)

FIG. 3

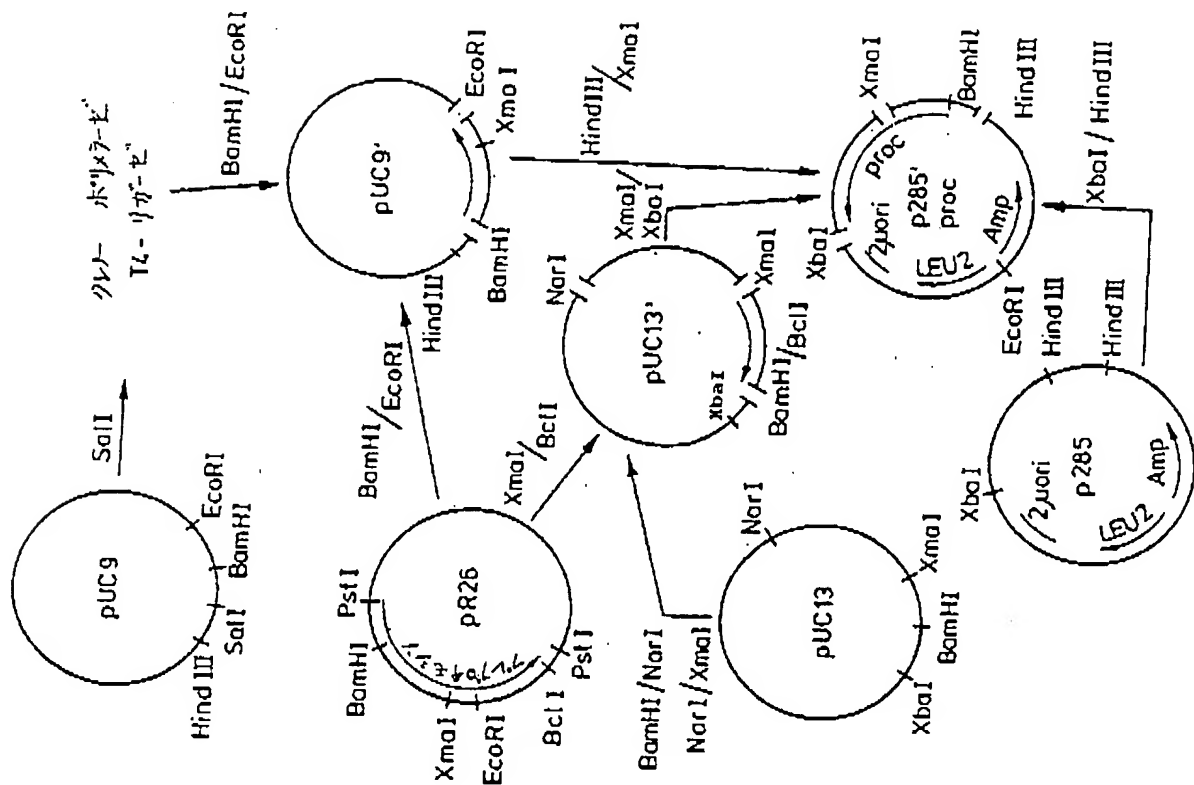


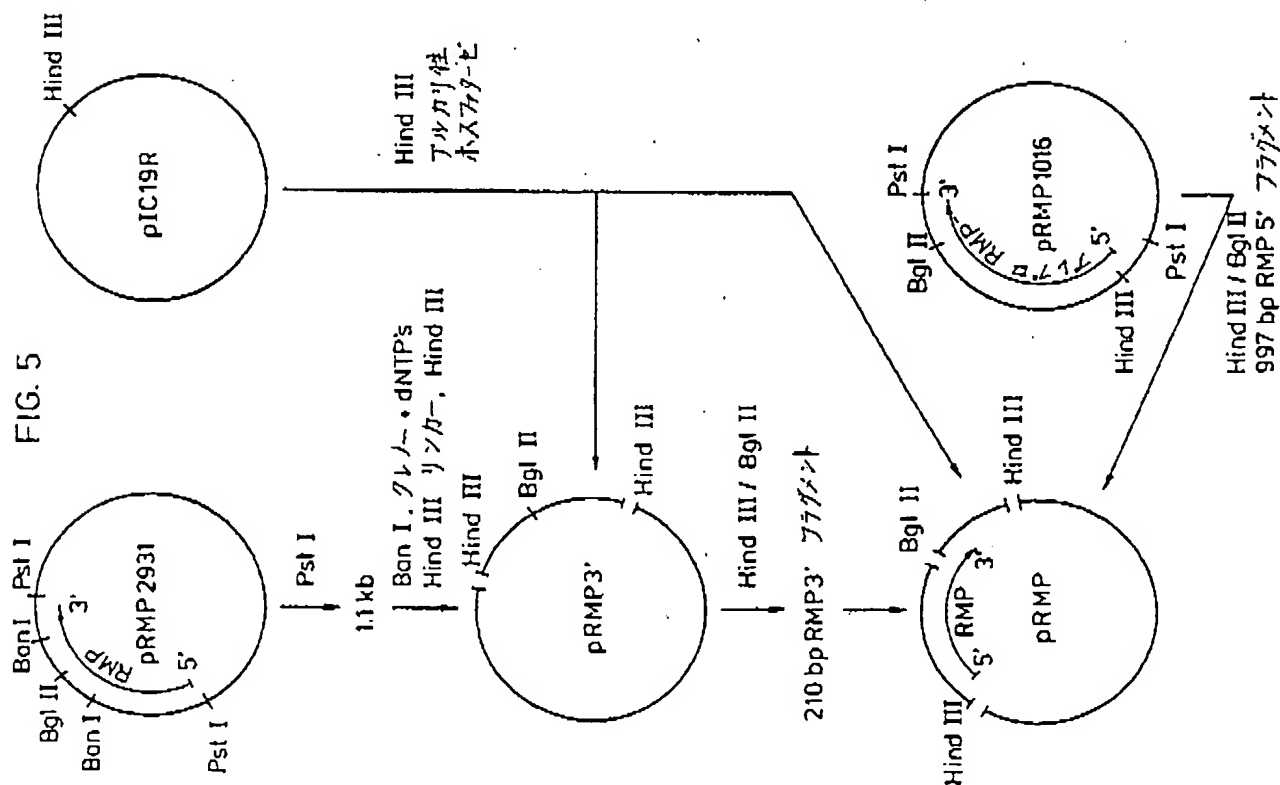
FIG. 4a

ATCAGATTCCGACC	ATG CTC TTC TCT CAG ATT ACT TCT GCG ATC CTT TTA	36
	MET LEU PHE SER GLN ILE THR SER ALA ILE LEU LEU	-38
ACA GCG GCT TCT TTG TCG GTT ACC ACT GCT CGC CCG GTA TCC AAG CAA		64
THR ALA ALA SER LEU SER LEU THR THR ALA ARG PRO VAL SER LYS GLN		-42
TCC GAG TCC AAG GAC AAG CTT CTG GCG CTT CCT CTC ACC TCG GTG TCC		132
SER GLU SER LYS ASP LYS LEU LEU ALA LEU PRO LEU THR SER VAL SER		-26
GCG AAG TTC TCT CAA ACC AAG TTC GGT CAG CAA CAA CTT GCT GAG AAG		180
ARG LYS PHE SER GLN THR LYS PHE GLY GLN GLN GLN LEU ALA GLU LYS		-10
CTA GCA GGT CTC AAG CCC TTC TCT GAA GCT GCG GCA GAC GGC TCC GTC		228
LEU ALA GLY LEU LYS PRO PHE SER GLU ALA ALA ALA ASP GLY SER VAL		7
GAT ACG CCC GGC TAT TAC GAC TTT GAT CTG GAG GAC TAT GCT ATT CCG		276
ASP THR PRO GLY TYR TYR ASP PHE ASP LEU GLU GLU TYR ALA ILE PRO		23
GTC TCC ATT GGT ACT CCT GGT CAA GAC TTT TTG CTC TTG TTC GAC ACT		324
VAL SER ILE GLY THR PRO GLY GLN ASP PHE LEU LEU LEU PHE ASP THR		39
GCC AGC TCC GAT ACT TGG GTT CCA CAC AAG GGT TGC ACC AAG TCT GAA		372
GLY SER SER ASP THR TRP VAL PRO HIS LYS GLY CYS THR LYS SER GLU		93
GGT TGT GTT GCG AGC CGA TTC TTT GAT CCA TCG GCT TCC TCC ACT TTT		420
GLY CYS VAL GLY SER ARG PHE PHE ASP PRO SER ALA SER SER THR PHE		71
AAA GCA ACT AAC TAC AAC CTA AAC ATC ACC TAC GGT ACT GGC GGC GCA		468
CYS ALA THR ASN TYR ASN LEU ASN ILE THR TYR GLY THR GLY GLY ALA		87
AAC GGT CTT TAC TTT GAA GAC AGC ATC GCT ATC GGC GAC ATC ACC CTG		516
ASN GLY LEU TYR PHE GLU ASP SER ILE ALA ILE GLY ASP ILE THR VAL		103
ACC AAG CAA ATT CTG GCT TAC GTC GAT AAT GTT CCG GGC CCA ACT GCT		564
THR LYS GLN ILE LEU ALA TYR VAL ASP ASN VAL ARG GLY PRO THR ALA		119
GAG CAG TCT CCT AAC GCT GAC ATT TTC CTT GAT GGT CTC TTT GGT GCA		612
GLU GLN SER PRO ASN ALA ASP ILE PHE LEU ASP GLY LEU PHE GLY ALA		135
GCC TAC CCA GAC AAC ACC GCC ATG GAA GCA GAG TAT GGA TCG ACT TAT		660
ALA TYR PRO ASP ASN THR ALA MET GLU ALA GLU TYR GLY SER THR TYR		151

特開昭62-272988 (26)

FIG. 4b

AAC ACT GTT CAC GTC AAC CTC TAC AAG CAA GGC TTG ATC TCT TCT GCT 708
 ASN THR VAL HIS VAL ASN LEU TYR LYS GLN GLY LEU ILE SER SER PRO 167
 CTT TTC TCG GTC TAC ATG AAC ACT AAC AGC GGC ACT GGA GAG GTC GTC 756
 LEU PHE SER VAL TYR MET ASN THR ASN SER GLY THR GLY GLU VAL VAL 183
 TTT GGT GGA GTC AAC AAC ACG CTT CTC GGC GGC GAC ATT GCC TAC ACG 804
 PHE GLY GLY VAL ASN ASN THR LEU LEU GLY GLY ASP ILE ALA TYR THR 199
 GAC GTT ATG AGT CGT TAT GGT GGT TAT TAC TTC TGG GAC GCA CCC GTC 852
 ASP VAL MET SER ARG TYR GLY GLY TYR TYR PHE TRP ASP ALA PRO VAL 215
 ACA GGT ATC ACC GTC GAT GGA TCT GCT GCT GTC AGG TTC TCG AGA CCC 900
 THR GLY ILE THR VAL ASP GLY SER ALA ALA VAL ARG PHE SER ARG PRO 231
 CAA GCA TTC ACC ATC GAT ACT GGC ACC AAC TTT TTC ATT ATG CCC TCA 948
 GLN ALA PHE THR ILE ASP THR GLY THR ASN PHE PHE ILE MET PRO SER 247
 AGC GCC GCT TCT AAG ATT GTC AAA GCA GCT CTC CCT GAT GCC ACT GAA 996
 SER ALA ALA SER LYS ILE VAL LYS ALA ALA LEU PRO ASP ALA THR GLU 263
 ACC CAG CAG GGC TGG GTT GTT GCT TGC GCT AGC TAC CAG AAC TCC AAG 1044
 THR GLN GLN GLY TRP VAL VAL PRO CYS ALA SER TYR GLN ASN SER LYS 279
 TCG ACT ATC AGC ATC GTC ATG CAA AAG TCC GGC TCA AGC AGT GAC ACT 1092
 SER THR ILE SER ILE VAL MET GLN LYS SER GLY SER SER SER ASP THR 295
 ATT GAG ATC TCG GTT CCT GTC AGC AAA ATG CTT CTT CCA GTC GAC CAA 1140
 ILE GLU ILE SER VAL PRO VAL SER LYS MET LEU LEU PRO VAL ASP GLN 311
 TCG AAC GAG ACT TGC ATG TTT ATC ATT CTT CCC GAC GGT GGT AAC CAG 1188
 SER ASN GLU THR CYS MET PHE ILE ILE LEU PRO ASP GLY GLY ASN GLN 327
 TAC ATT GTT GGC AAC TTG TTC CTG CCG TTC TTT GTC AAT GTT TAC GAC 1236
 TYR ILE VAL GLY ASN LEU PHE LEU ARG PHE PHE VAL ASN VAL TYR ASP 343
 TTT GGC AAC AAC CGT ATC GGC TTT GCA CCT TTG GCC TCG GCT TAT GAA 1284
 PHE GLY ASN ASN ARG ILE GLY PHE ALA PRO LEU ALA SER ALA TYR GLU 359
 AAC GAG TAA AGGGGACCAATTCTTTTAGCTGCTCAGATAACTTTGTAACCTCTCTGA 1343
 ASN GLU TERM
 TATACCTTTTATAACCTTTATTTCTCACTTTTAACTGTATTCGAATACCTTATTTCTCT 1402



特開昭62-272988 (26)

FIG. 6

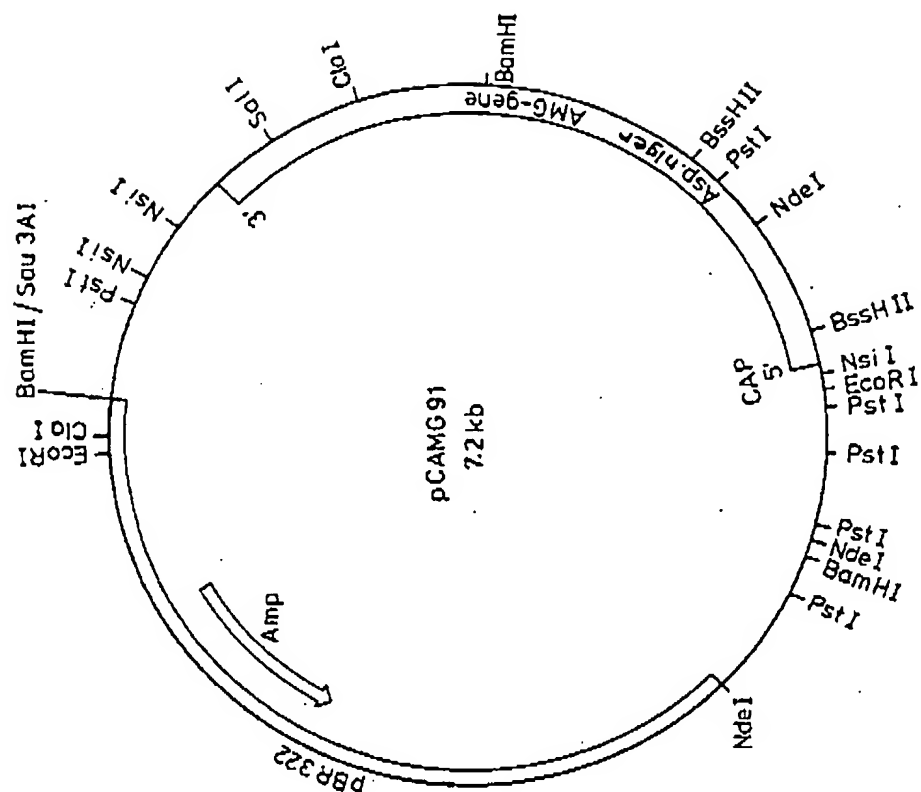
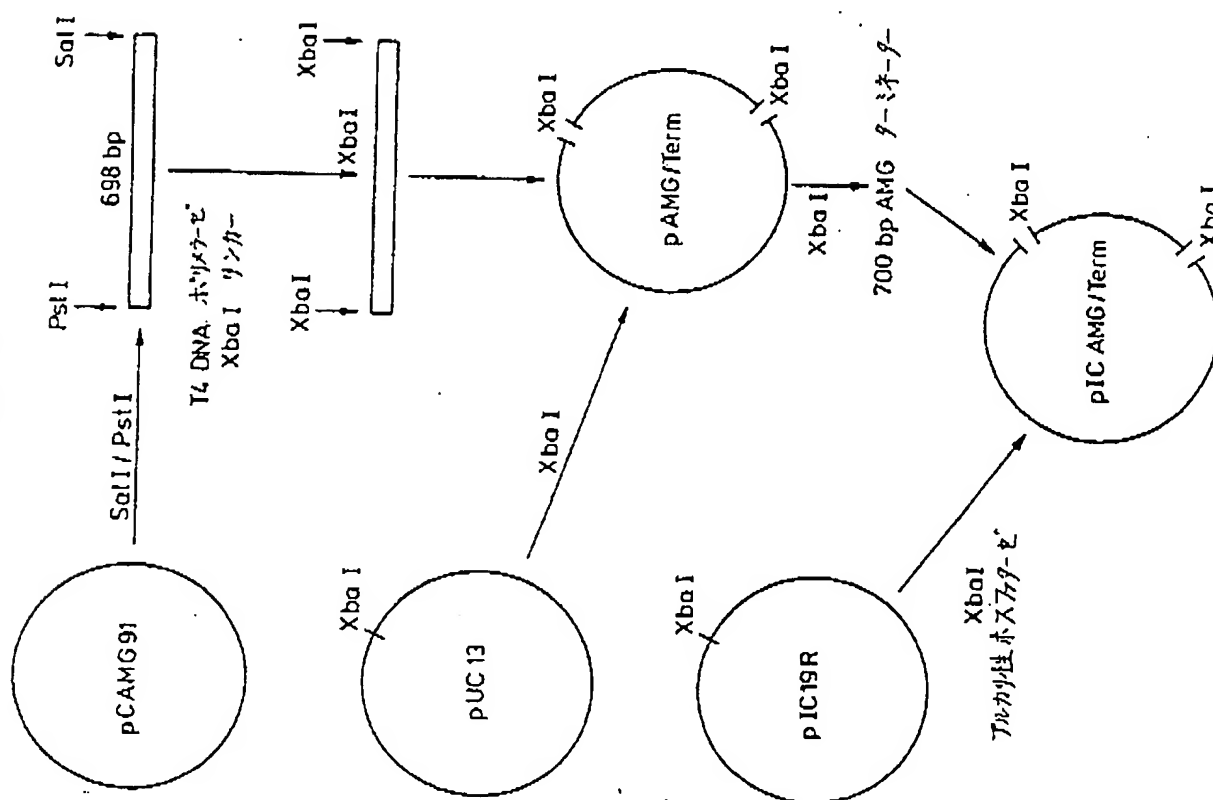


FIG. 7a



特開昭62-272988 (27)

FIG. 7b

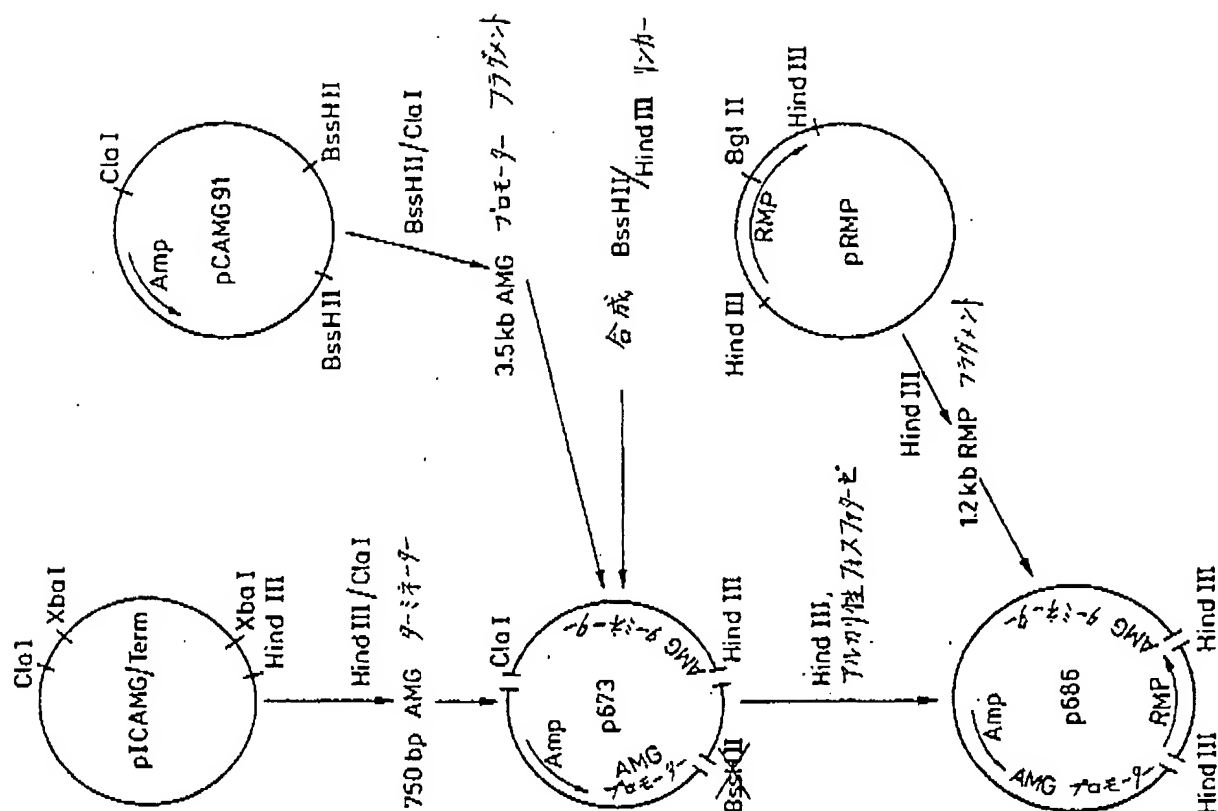
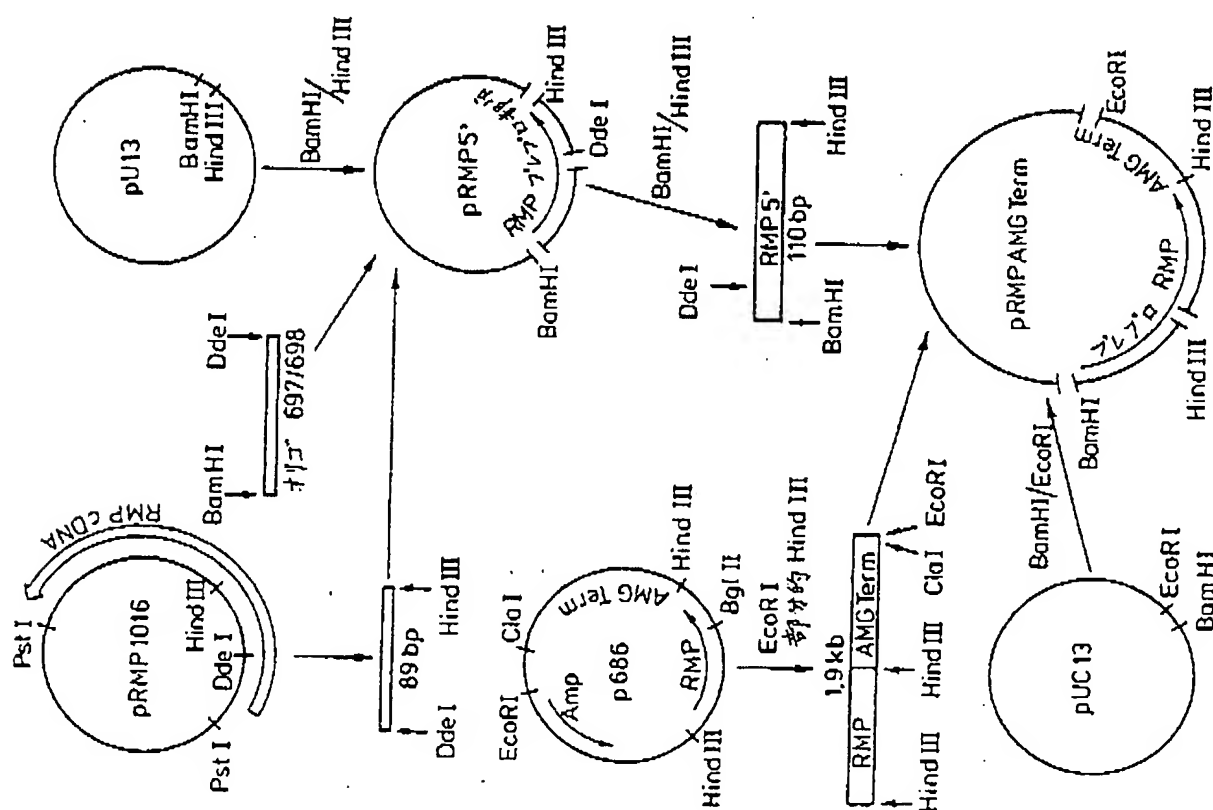


FIG. 8



特開昭62-272988 (28)

FIG. 9a

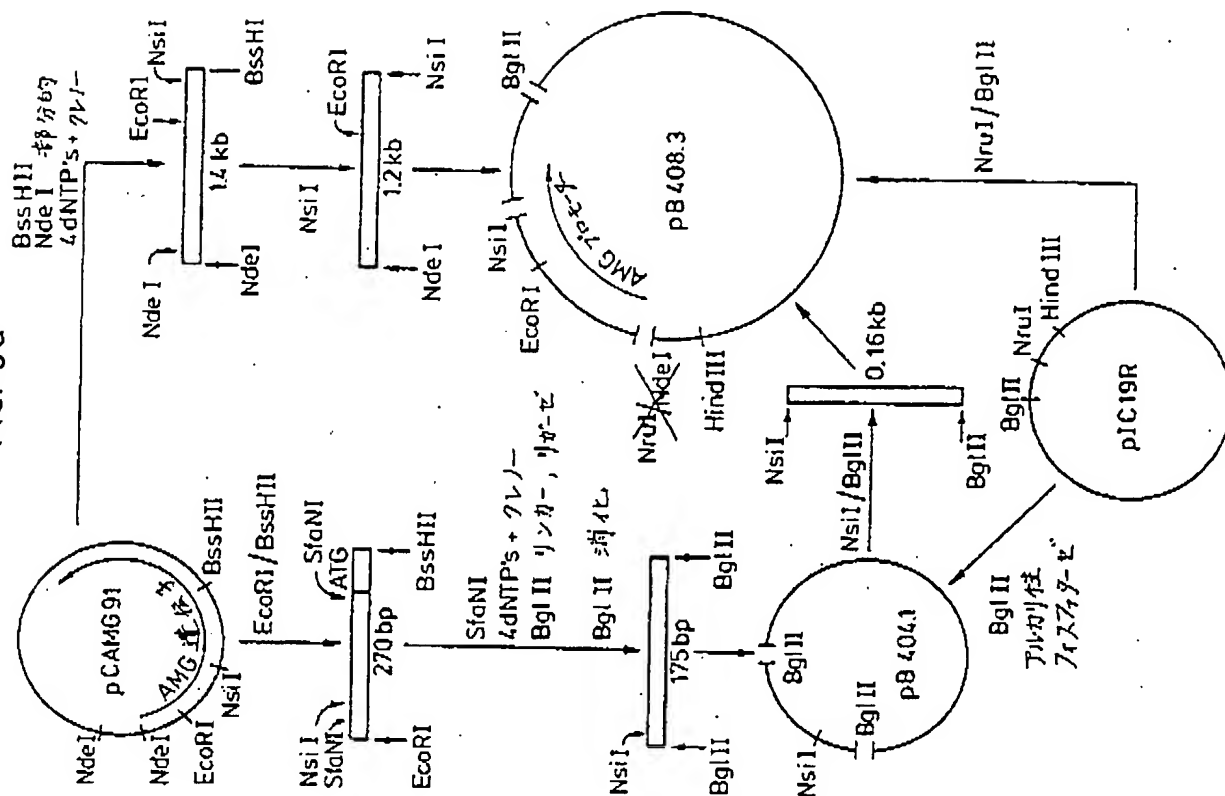
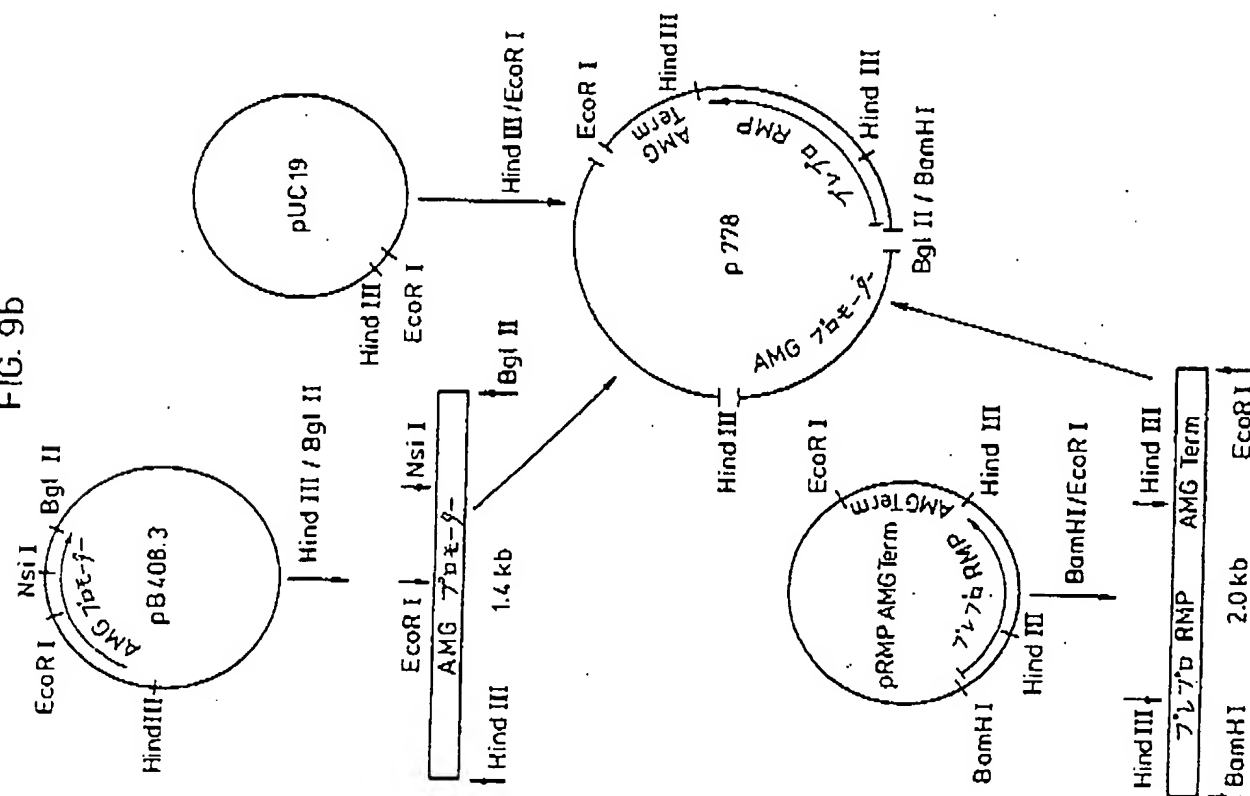


FIG. 9b



特開昭62-272988 (29)

FIG. 10

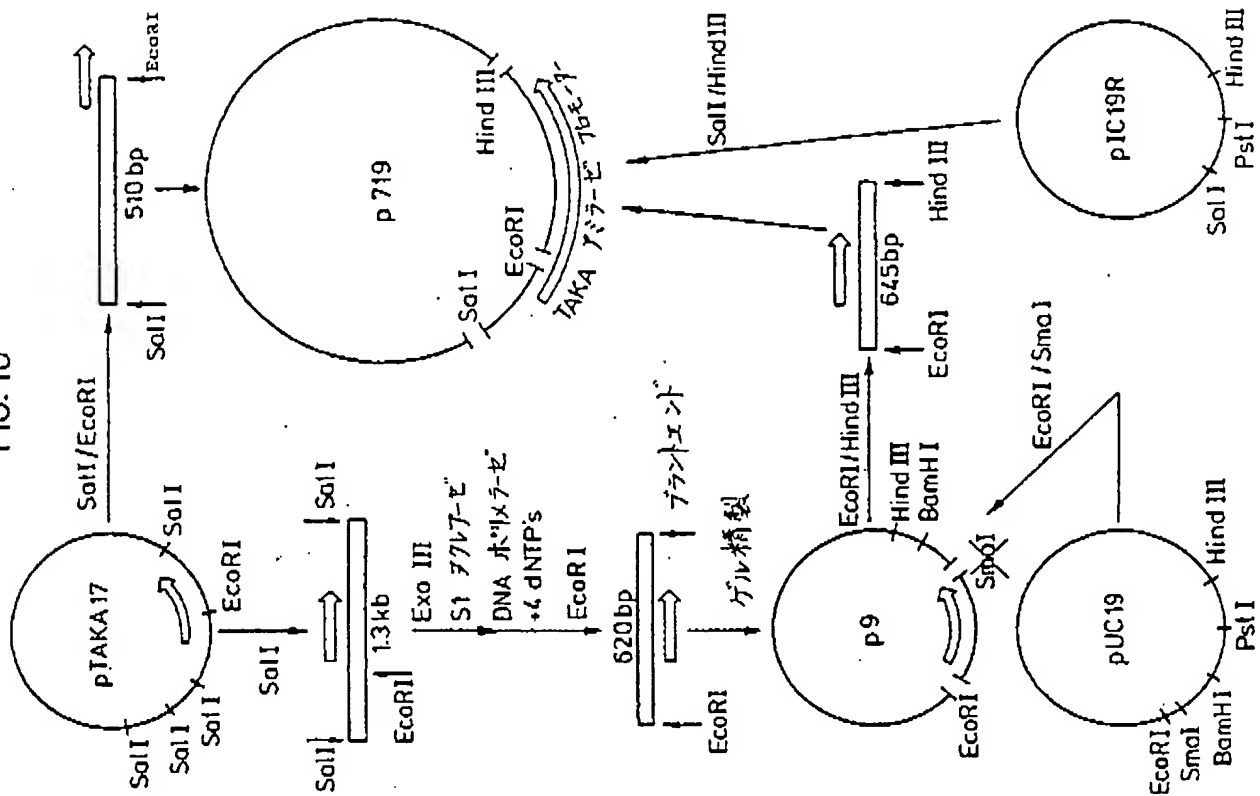
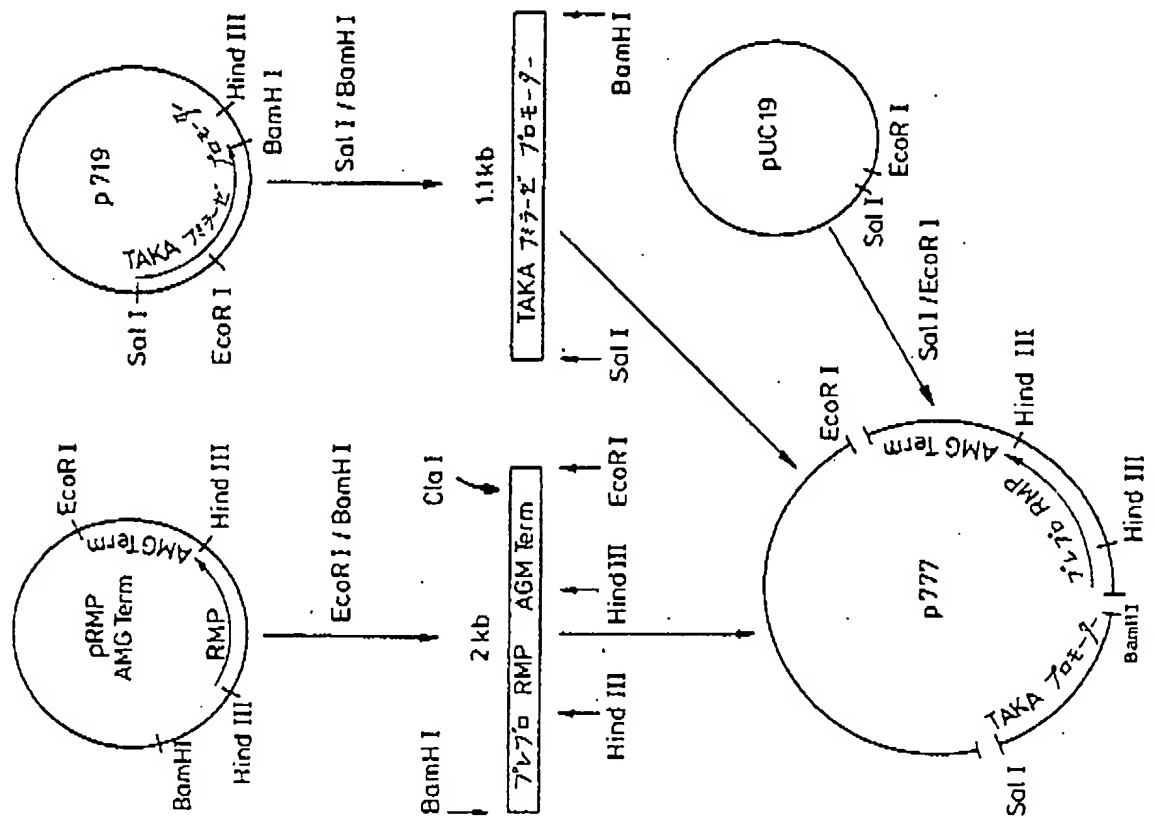


FIG. 11



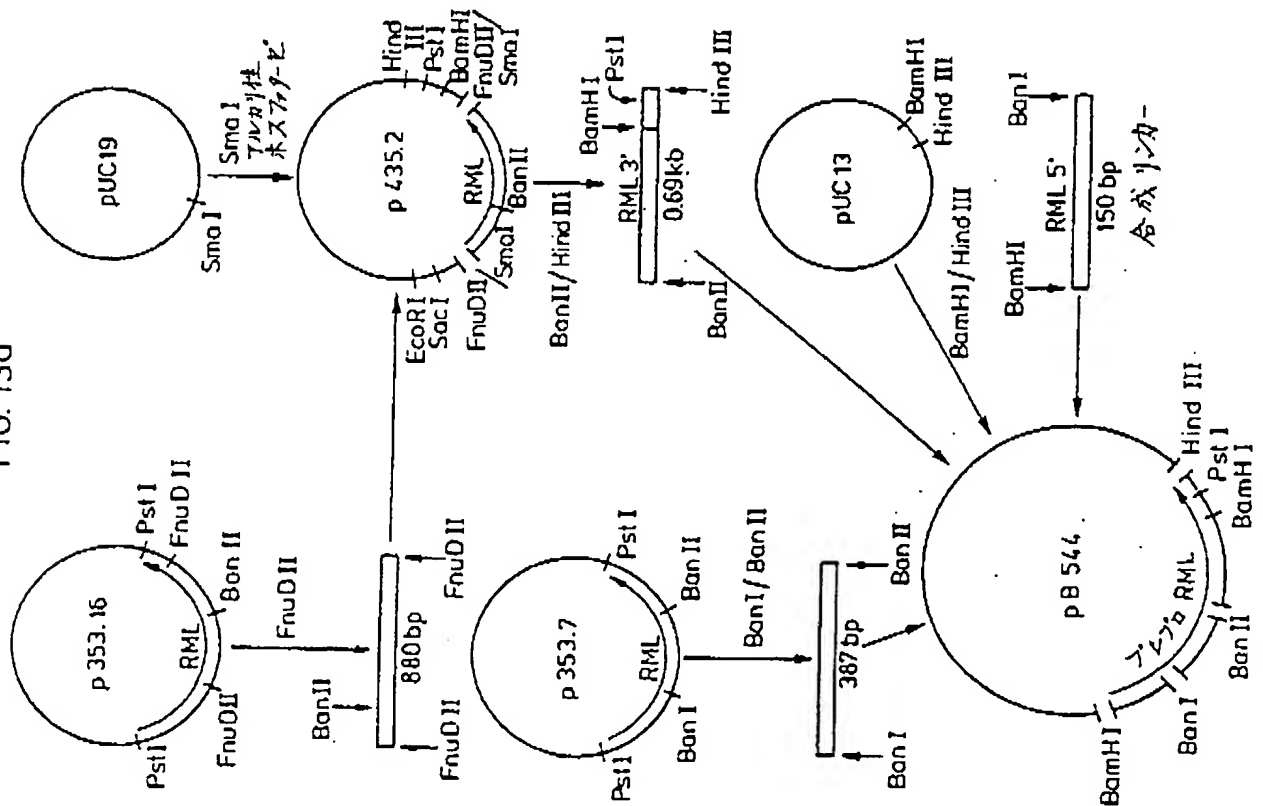
特開昭62-272988 (30)

FIG. 12

-11
 ATCAGAACATC ATG GTT CTC AAG CAG CGT GCA AAC TAT CTG GGC TTT CTG ATT GTA TTC TTC 51
 MET VAL LEU LYS GLN ARG ALA ASN TYR LEU GLY PHE LEU ILE VAL PHE PHE -78
 ACG GCG TTC CTG GTC GAA GCG GTG CCA ATC AAG AGA CAA TCA AAC ACG ACG GTG GAT AGT 111
 THR ALA PHE LEU VAL GLU ALA VAL PRO ILE LYS ARG GLN SER ASN SER THR VAL ASP SER -58
 CTG CCA CCC CTC ATC CCC TCT CGA ACC TCG GCA CCT TCA TCA CCA AGC ACA ACC GAC 171
 LEU PRO PRO LEU ILE PRO SER ARG THR SER ALA PRO SER SER SER PRO SER THR THR ASP -38
 CCT GAA GCT CCA GCG ATG ACT CCG AAT GGA CCG CTG CCC TCG CAT GTA CAG ACT AAA TAT 231
 PRO GLU ALA PRO ALA MET SER ARG ASN GLY PRO LEU PRO SER ASP VAL GLU THR LYS TYR -18
 GGC ATG GCT TIG AAT GCT ACT TCC TAT CCG GAT TCT GTG GTC CAA GCA ATG ACG ATT GAT 291
 GLY MET ALA LEU ASN ALA THR SER TYR PRO ASP SER VAL VAL GLN ALA MET SER ILE ASP 3
 GGT GGT ATC CCG GCT GCG ACC TCG CAA GAA ATC AAT GAA TTG ACT TAT TAC ACT ACA CTA 351
 GLY ILE ARG ALA ALA THR SER GLN GLU ILE ASN GLU LEU THR TYR THR THR LEU 23
 TCT GCG AAC TCG TAC TCG CCG ACT GTC ATT CCT GGA GCT ACC TGS GAC TGT ATC CAC TGT 411
 SER ALA ASN SER TYR CYS ARG THR VAL ILE PRO GLY ALA THR TRP ASP CYS ILE HIS CYS 43
 GAT GCA ACG GAG GAT CTC ARG ATT ATC AAG ACT TGG ACG CCG CTC ATC TAT GAT ACA AAT 471
 ASP ALA THR GLU ASP LEU LYS ILE LYS THR TRP SER THR LEU ILE TYR ASP THR ASN 63
 GCA ATG GTT GCA CGT GGT GAT ACG GAA AAA ACT ATC TAT ATC GTT TTC CGA GGT TCG ACG 531
 ALA MET VAL ALA ARG GLY ASP SER GLU LYS THR ILE TYR ILE VAL PHE ARG GLY SER SER 83
 TCT ATC CCG AAC TGG ATT GCT GAT CTC ACC TTT GTG CCA GTT TCA TAT CCT CCG GTC AGT 591
 SER ILE ARG ASN TRP ILE ALA ASP LEU THR PHE VAL PRO VAL SER TYR PRO VAL SER 103
 GGT ACA AAA GTA CAC AAG GGA TTC CTG GAC AGT TAC GGG CAA GTT CAA AAC GAG CTT GTT 651
 GLY THR LYS VAL HIS LYS GLY PHE LEU ASP SER TYR GLY GLU VAL GLN ASN GLU LEU VAL 123
 GCT ACT GTT CTT GAT CAA TTC AAG CAA TAT CCA ACG TAC AAG GTT GCT GTT ACA GGT CAC 711
 ALA THR VAL LEU ASP GLN PHE LYS GLN TYR PRO SER TYR LYS VAL ALA VAL THR GLY HIS 143
 TCA CTC GGT GCT ACT GCG TTG CTT TGC GCG CTG GGT CTC TAT CAA CCG GTA GCG CAC CTT GCG 831
 SER LEU GLY GLY ALA THR ALA LEU LEU CYS ALA LEU GLY LEU TYR GLN ARG GLU GLY 163
 CTC TCA TCG ACG ACG TIG TTC CTT TAC ACT CAA GGT CAA CCA CCG GTA GCG GAC CTT GCG 871
 LEU SER SER SER ASN LEU PHE LEU TYR THR GLN GLY GLN PRO ARG VAL GLY ASP PRO ALA 183
 TTT GCG AAC TAC GTT GTT ACG ACC GCG ATT CCT TAC ACG CCG ACG GTC AAT GAA CCA GAT 891
 PHE ALA ASN TYR VAL VAL SER THR GLY ILE PRO TYR ARG ARG THR VAL ASN GLU ARG ASP 203
 ATC GTT CCT CAT CTT CCA CCT GCT TTT GGT TTT CTC CAC GCT GCG GAG GAG TAT TGG 951
 ILE VAL PRO HIS LEU PRO PRO ALA PHE GLY PHE LEU HIS ALA GLY GLU GLU TYR TRP 223
 ATT ACT GAC AAT ACG CCA GAG ACT GTT CAG GTC TCG ACA ACG GAT CTG GAA ACC TCT GAT 1011
 ILE THR ASP ASN SER PRO LEU THR VAL GLN VAL CYS THR SER ASP LEU GLU THR SER ASP 243
 TGC TCT AAC ACG ATT GTT CCC TTC ACA AGT GTT CTT GAC CAT CTC TCG TAC TTT GGT ATC 1071
 CYS SER ASN SER ILE VAL PRO PHE THR SER VAL LEU ASP HIS LEU SER TYR PHE GLY ILE 263
 AAC ACA GCG CTC TGT ACT TAA GAAATACCACTATACATATAGGAGTAGTAGTATTTTAGGAGAGATT 1131
 ASN THR GLY LEU CYS THR LEU

TATATGATTAACCAATATATATATATATACCGCTGGCGGAGAACCTGTATT PULYA

FIG. 13a



特開昭62-272988 (31)

FIG. 13b

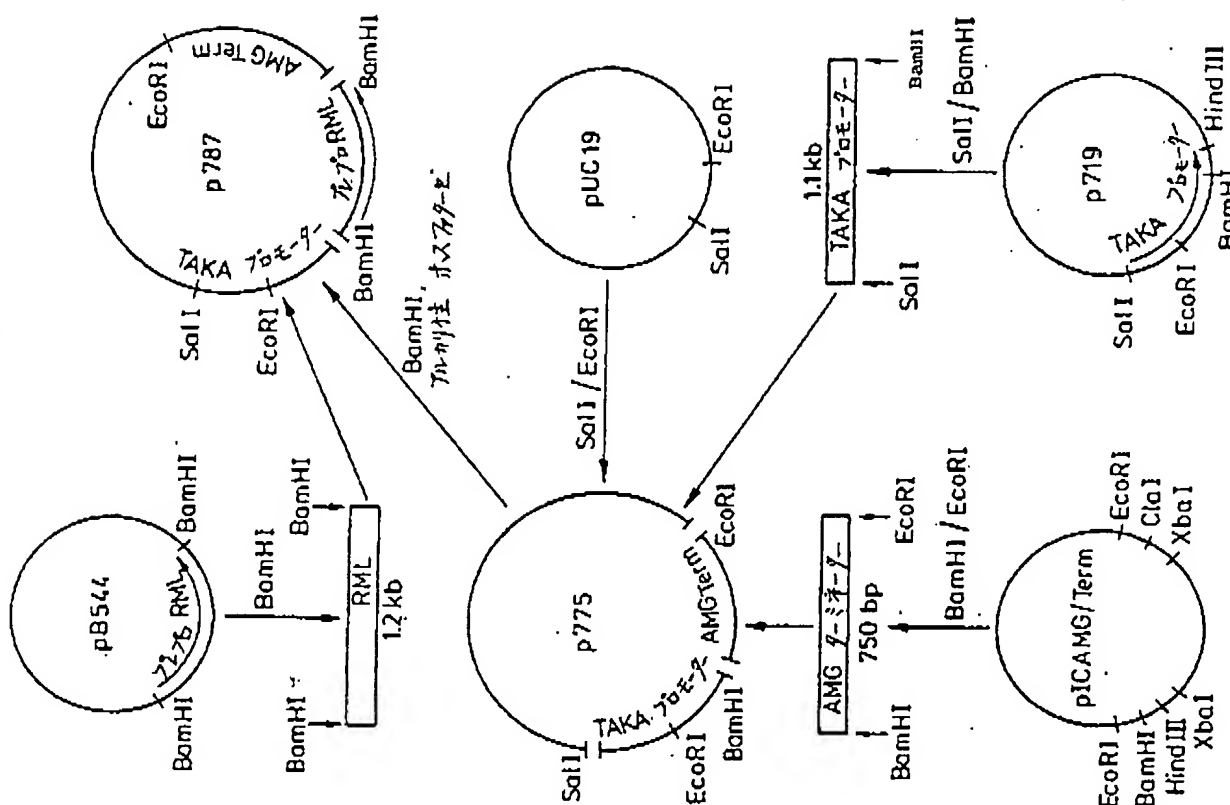


FIG. 14

RML5: A. 7772nt

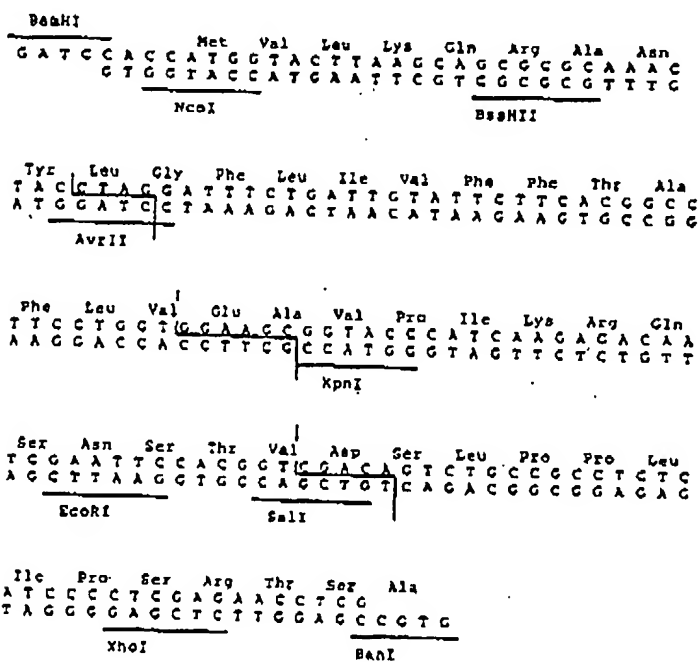


FIG. 15a

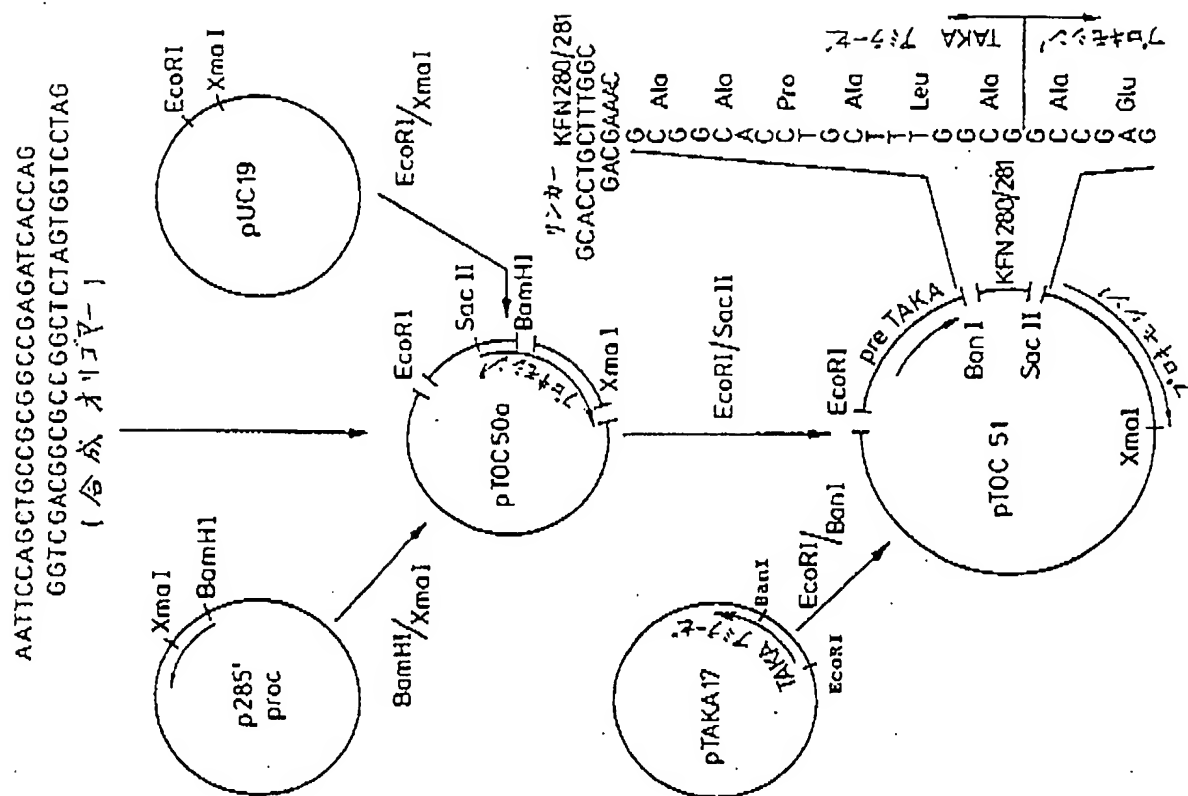
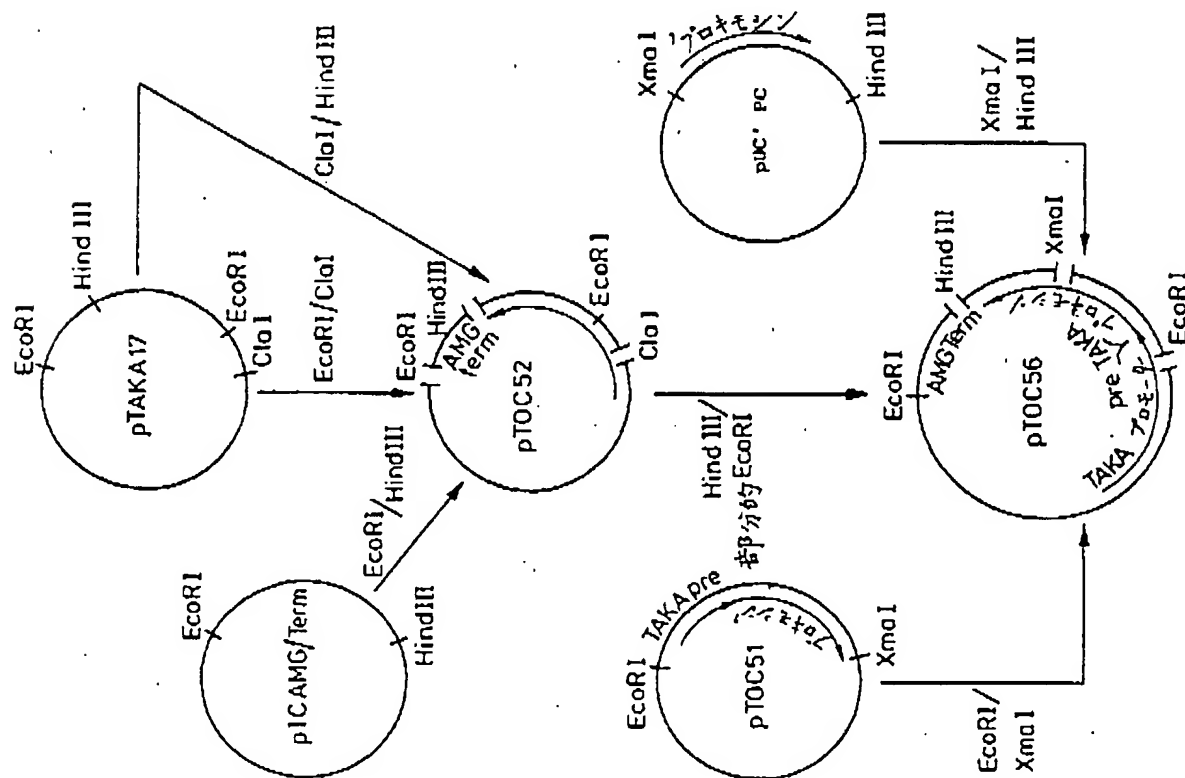


FIG. 15b



特開昭62-272988 (33)

手続補正書(方式)

昭和62年5月//日

特許庁長官 黒田明雄 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第60276号

2. 発明の名称

アスペルギルス オリザにおけるタンパク生成物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ノボ インダストリ アクティーゼルスカブ

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(5579) 青木 朗

(外4名)

5. 補正命令の日付

自発補正

6. 補正の対象

(1) 明細書

(2) 原寄託についての受託証の写

7. 補正の内容

(1) 明細書の浄書(内容に変更なし)

(2) 別紙の通り

8. 添付書類の目録

(1) 浄書明細書

1通

(2) 原寄託についての受託証

の写及び訳文

各1通



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.